مروری بر تحقیقات صنایع شیر ایران در تولید و اثر بخشی فرآورده‌های شیری پروبیوتیک

مفید، وحید، معاون تحقیق و توسعه و هماهنگی تولید شرکت صنایع شیر ایران vmofid@yahoo.com0

چکیده:

در سال‌های اخیر مفهوم غذاهای عملگرا به عنوان غذاهایی که علاوه بر داشتن اثرات تغذیه‌ای، اثرات مثبت بر روی سلامتی انسان دارند، بیشتر به سمت غذاهایی که می‌توانند اثرات مثبت روی ترکیب جمعیت میکروبی روده داشته باشند، تغییر جهت داده و عمدتا روی غذاهای پروبیوتیک متمرکز شده است.

به دلیل آگاهی مصرف‌کنندگان از اثرات سلامتی بخش فرآورده‌های پروبیوتیک، تولید و مصرف این محصولات روند رو به رشدی داشته است. برای اینکه فرآورده های شیری پروبیوتیک اثرات سلامتی بخش خود را داشته باشند، لازم است تا جمعیت زیادی از باکتری‌های پروبیوتیک (10^6 -10^7cfu/gr) در طول نگهداری فرآورده تا زمان انقضا آن، زنده و فعال باقی بمانند و در عین حال محصول نیز از خصوصیات حسی و بافتی مطلوبی برخوردار باشد.

امروزه شیر و فرآورده‌های آن با داشتن ویژگی‌های تغذیه‌ای و تکنولوژیکی خاص بعنوان حاملان باکتری‌های پروبیوتیک، مورد توجه قرار گرفته‌اند. از آنجا که اغلب باکتری‌های پروبیوتیک قابلیت تولید و کشت در فرآورده‌های لبنی مانند شیر آشامیدنی، ماست، دوغ، بستنی و ... را دارا هستند انگیزه تولید آنها در صنعت لبنیات افزایش یافته است و تاکنون محصولات لبنی پروبیوتیک مختلف و متعددی در دنیا تولید شده‌اند.

در این راستا شرکت صنایع شیر ایران طرح‌های تحقیقاتی متعددی را در زمینه توسعه تکنولوژی تولید فرآورده‌های شیری پروبیوتیک و ارزیابی اثربخشی آنها با دانشگاههای مختلف به مرحله اجرا گذاشته است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، اثربخشی، فرآورده‌های لبنی

مقدمه:

واژه "پروبیوتیک" در زبان یونانی به معنی حیات بخش بوده و بنا به تعریف، عبارت است از میکروارگانیسم‌های زنده ای که چنانچه به مقدار کافی مصرف شوند اثرات مفیدی بر سلامت مصرف‌کننده به جا می‌گذارند. تاثیر پروبیوتیک‌ها بر فلور میکروبی دستگاه گوارش و ایفای نقش درمانی آنها به مقدار مصرف روزانه این باکتری‌ها مربوط بوده و معمول‌ترین محدوده تعریف شده برای تراکم حضور باکتری‌های پروبیوتیک زنده 10^6 -10^7cfu در هر گرم ذکر شده است.

ویژگیهای منحصر به فرد میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها) در حفظ تعادل میکروفلور روده‌ای انسان و بهبود اختلالات گوارشی، کاهش کلسترول خون، بهبود سیستم ایمنی بدن، افزایش جذب مواد معدنی، جلوگیری از بروز سرطان هایی مثل کولون، مثانه و دهها اثر سودمند دیگر، موجب شده است تا تلاش برای جای دادن آنها در رژیم غذایی انسان مستمرتر شود.

شیر و فرآورده‌های شیری به علت دارا بودن بسیاری از مواد مغذی ضروری، محیط قابل قبول و مناسبی برای رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. امروزه فرآورده‌های شیری نه تنها از نظر تحقیقات بلکه در بازار تجارت جهانی رونق فراوانی یافته‌اند. مهم‌ترین عوامل موثر بر اقبال این محصولات، اثرات سلامتی‌بخش، ویژگی‌های تغذیه‌ای مطلوب، خصوصیات حسی منحصر به فرد و افزایش ماندگاری آنها می‌باشد.

در این راستا شرکت صنایع شیر ایران طرح‌های تحقیقاتی متعددی را در زمینه توسعه تکنولوژی تولید فرآورده‌های شیری پروبیوتیک و ارزیابی اثربخشی آنها با دانشگاههای مختلف به مرحله اجرا گذاشته است که در این مقاله به اختصار به آنها اشاره شده است.

پروژه‌اجرا شده:

مطالعه 1: عنوان پروژه:

تولید ماست پروبیوتیک با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) و استرپتوکوکوس ترموفیلوس (STB-01) و بررسی عوامل موثر بر تولید این فرآورده

واحد همکار: دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز (خانم کارآمد – آقای دکتر کرباسی)

هدف طرح:

هدف طرح بررسی موارد زیر برای تولید ماست پروبیوتیک می‌باشد:

- رشد و ویژگی سوشهای خالص لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) و استرپتوکوکوس ترموفیلوس (STB-01) در محیط شیر
- ترکیباتی جهت بهبود رشد و ماندگاری این باکتریها در محیط شیر
- فرمولاسیونی مناسب و قابل قبول مصرف کننده و متناسب با شرایط رشد میکروارگانیسمهای پروبیوتیک

متدولوژی:

در این تحقیق به بررسی تولید ماست پروبیوتیک با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) و استرپتوکوکوس ترموفیلوس (STB-01) پرداخته شد. با توجه به اینکه حضور مقدار معینی از باکتری‌ها (10^6 -10^7 cfu/gr) در مدت زمان تعریف شده مصرف فرآورده های پروبیوتیک (14- 12روز) حائز اهمیت می‌باشد، هرچه محیط و شرایط مناسب‌تری برای رشد آغازگرهای پروبیوتیک فراهم شود، رشد آنها تسریع می‌گردد. برای بهینه‌سازی رشد این میکروارگانیسم‌ها و دستیابی به فرآورده‌ای با ویژگی‌های پروبیوتیکی، فاکتورهای دیگری مانند نسبت مناسب میان آغازگرهای مورد استفاده و کاربرد افزودنی‌هایی که بر رشد آغازگرهای مصرفی تاثیر می‌گذارند ، مورد بررسی قرار گرفتند.

سوش‌های خالص آغازگرهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) بعنوان میکروارگانیسم های پروبیوتیک، و استرپتوکوکوس ترموفیلوس (STB-01) جهت کوتاه نمودن زمان در تولید این فرآورده مورد استفاده قرار گرفتند. برای بدست آوردن نسبت مناسب این باکتری‌ها، نسبت‌های متفاوتی از آغازگرهای پروبیوتیک بکار رفت.

لازم به توضیح است که نسبت استرپتوکوکوس ترموفیلوس (STB-01) همواره یک پنجاهم نسبت بکارگیری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) و بیفیدوباکتریوم (BB-12) بوده است.

پس از تهیه نمونه ماستهای مورد نظر با نسبتهای متفاوت آغازگرها (جدول1) آزمایشات شیمیایی و میکروبی در روز تولید 3، 6، 9، 12 روز پس از تولید انجام شد.

جدول 1– نسبت‌های متفاوت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) و بیفیدوباکتریوم (BB-12)

شماره	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5)	بیفیدوباکتریوم (BB-12)
1	1	1
2	2	1
3	3	1
4	4	1
5	1	2
6	1	3
7	1	4
8	3	2
9	2	3
10	4	3
11	3	4

بحث و نتایج:

با توجه به نتایج بدست آمده از میزان رشد آغازگرهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) و تستهای pH ، اسیدیته قابل تیتراسیون و همچنین در نظر گرفتن میزان ماده خشک و ویژگی‌های ظاهری (قوام بافت و یکنواختی لخته) در مقایسه با نمونه شاهد، نمونه تولیدی با نسبت 3:1 ، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) به بیفیدوباکتریوم (BB-12) مناسب تشخیص داده شد.

لازم به توضیح است که نمونه شاهد در این آزمایش ماست تولیدی پگاه با سوش‌های

L. *delbrueckii subsp. bulgaricus*(YF-L811) و *S.thermophilus*(CH-1) بود که در نسبت‌های به ترتیب 3 به 2 و به میزان 1 گرم بر لیتر استفاده شد.

برای رشد هرچه بهتر پروبیوتیک‌ها در این فرآورده، افزودنی‌هایی مانند کازئینات سدیم، اسید آمینه والین، پپتون با منشا کازئین بصورت پودر و محلول کربنات سدیم (5٪) مورد بررسی قرار گرفتند، که هر یک از این محصولات تاثیرات متفاوتی را بر رشد آغازگرهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) و همچنین کیفیت نهایی فرآورده داشتند که نتایج مربوطه نشان داد افزودن محلول 5٪ کربنات سدیم بمیزان 8 میلی لیتر بر لیتر تاثیرات مطلوبی را بر رشد آغازگرهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (La-5) ، بیفیدوباکتریوم (BB-12) و ویژگی‌های ظاهری فرآورده دارا می‌باشد. در این قسمت تاثیر تثبیت کننده ژلاتین نیز بر رشد آغازگر های مورد استفاده بررسی شد که نتایج حاکی از آن بود که افزودن 0/8 درصد ژلاتین از لحاظ جمعیت میکروبی و ویژگی‌های ظاهری و ارزیابی حسی محصول مناسب می‌باشد.

مطالعه 2 : عنوان پروژه:

تولید شیر تخمیر شده پروبیوتیکی (نوشیدنی) با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم

واحد همکار: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (خانم مویدنیا – آقای دکتر احسانی)

هدف طرح:

- بررسی روند رشد و فعالیت آغازگرهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم در شیر استریل 2/5 درصد
- بررسی امکان تولید نوشیدنی پروبیوتیکی تخمیر شده
- تعیین محدوده زمانی تعریف شده جهت پیشنهاد بعنوان بهترین زمان ماندگاری و مصرف سه محصول شیر اسیدوفیلوس، شیر بیفیدوس و شیر اسیدوبیفیدوس

متدولوژی:

در این پژوهش امکان تولید نوشیدنی پروبیوتیکی تخمیر شده و تعیین محدوده زمانی تعریف شده جهت پیشنهاد بعنوان بهترین زمان ماندگاری و مصرف سه نوشیدنی تخمیری شیری پروبیوتیکی به نام شیرهای اسیدوفیلوس، شیر بیفیدوس و شیر اسیدوبیفیدوس که بترتیب حاوی دو سویه پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس به شکل مجزا و مشترک، بررسی گردید.

در ضمن مراحل این طرح، تغییرات pH و اسیدیته و جمعیت پروبیوتیک‌ها و نحوه رفتار این دو باکتری در کشتهای مجزا و مشترکشان در شیر استریل 2/5 درصد چربی در مدت انکوباسیون 12 ساعته در دمای 37 درجه سانتیگراد، و در مدت دوره بیست و یک روزه نگهداری در سردخانه 5 درجه بدست آمد. در نهایت برای تعیین سطح قابلیت پذیرش این فرآورده‌ها از جانب مصرف کننده، دو ارزیابی حسی بکار گرفته شد و در این آزمون‌ها شیر UHT بعنوان نمونه شاهد انتخاب شد.

بحث و نتایج:

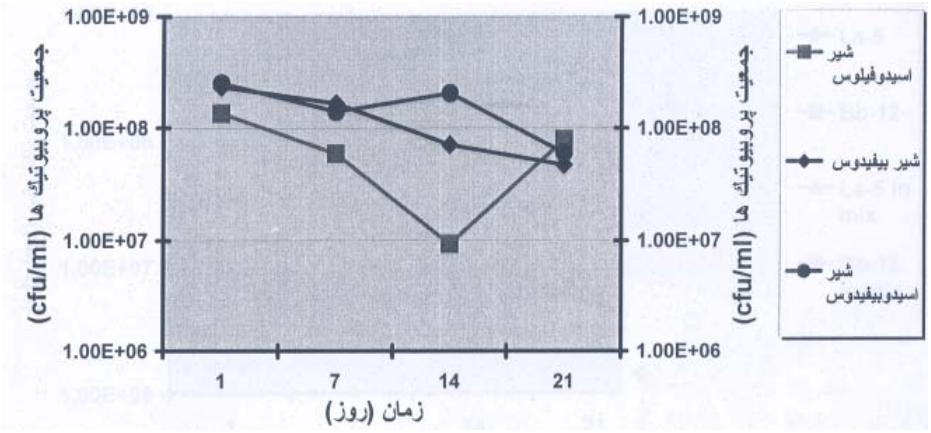
در مرحله اول این طرح که بمنظور انتخاب مدت زمان لازم برای انجام انکوباسیون مرحله دوم یعنی تولید محصول صورت گرفت منحنی‌های رشد دو باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در کنار منحنی‌های تغییرات اسیدیته و pH شیرهای تلقیح شده رسم گردید ، نتیجه اینکه محدوده زمانی 5 ساعت انکوباسیون با توجه به حداکثر فعالیت و استقرارشان در مرحله رشد لگاریتمی، انتخاب شد.

در ضمن در این مرحله مشخص شد که بیفیدوباکتر نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس رشد و فعالیت کندتری در شیر داشته ولی حضور لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در کنار آن به نسبت 1 به 1 رشد و فعالیتش را تسریع می‌کند.

نتایج نگهداری محصولات در سردخانه 5 درجه سانتیگراد نشان داد که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس همچون لاکتوباسیلوس بولگاریکوس مایه ماست، در سرما فعالیت آنزیماتیکی در جهت ایجاد پدیده اسیدیفیکاسیون بعدی را دارد ولی به نسبت کمتر. در حالیکه چنین حالتی در مورد بیفیدوباکتر مشاهده نگردیده که دلیل بر عدم فعالیت آنزیماتیکی آن در این راستا می‌باشد.

ضمناً درصد افت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مدت 2 هفته اول نگهداری در سرما نسبت به بیفیدوباکتر بیشتر می‌نمود که علت آنرا می‌توان علاوه بر سرمای محیط به تولید اسید توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز نسبت داد. جالب اینکه قابلیت زیستی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در شیرهای اسیدوفیلوس یا اسیدوبیفیدوس بعد از در پیش گرفتن روند کاهشی، افزایش ناگهانی نشان می‌داد که علت آن را می‌توان به سازگاری یا قدرت ترمیم احتمالی این باکتری در ضمن نگهداری و یا از هم پاشیدن احتمالی دسته‌جات متراکم آن نسبت داد. (شکل 1)

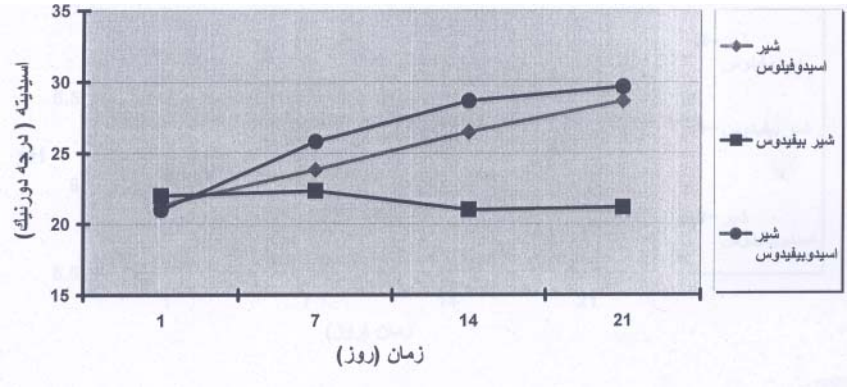
شکل 1 – مقایسه روند تغییرات جمعیت پروبیوتیک های سه محصول در طول 3 هفته نگهداری در سردخانه 5 درجه سانتیگراد



حضور هر دو باکتری در شیر، حساسیت هر دو را نسبت به افزایش اسیدیته، کاهش pH و حتی شوک‌های سرمایی وارده کاهش می‌داد (افزایش مقاومت).

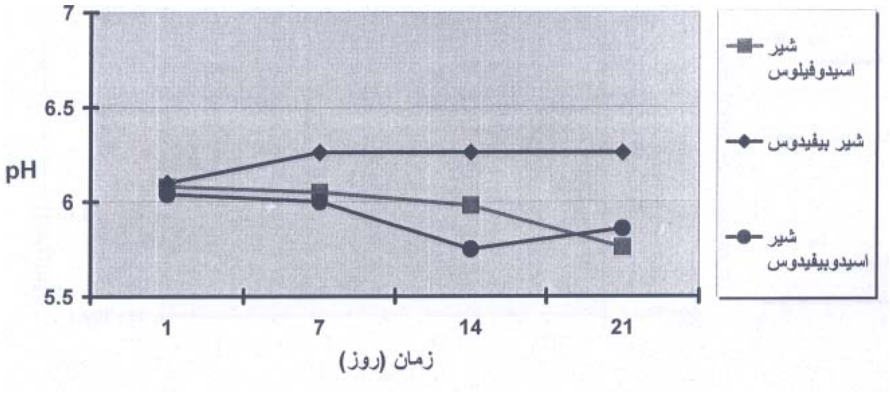
روند تغییرات اسیدیته در طی نگهداری 21 روزه در دو محصول شیر اسیدوفیلوس و شیر اسیدوبیفیدوس مشابه بود ولی در شیر بیفیدوس از هفته دوم نگهداری به بعد روند تغییر اسیدیته نسبت به دو محصول قبلی تفاوت معنی‌داری داشت که این موضوع را می‌توان به عدم فعالیت آنزیماتیکی یا فعالیت بسیار ضعیف آنزیماتیکی این باکتری در دمای 5 درجه نسبت داد. (شکل 2)

شکل 2 – مقایسه روند تغییرات اسیدیته در سه محصول در طول 3 هفته نگهداری در سردخانه 5 درجه سانتیگراد



روند تغییرات pH در هفته اول در هر سه محصول مشابه بود و تفاوت معنی‌داری بینشان دیده نمی‌شد ولی در هفته دوم این شاخص در بین 3 محصول روند تغییرات متفاوتی داشت و در هفته سوم روند تغییرات pH در شیر اسیدوفیلوس و اسیدوبیفیدوس مشابه و متفاوت از شیر بیفیدوس بود. دلیل این امر حضور لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دو شیر اول می‌باشد که در سرما نیز فعالیت آنزیماتیکی خوبی داشته و قادر به تولید اسید است. (شکل 3)

شکل 3 – مقایسه روند تغییرات pH در سه محصول در طول 3 هفته نگهداری در سردخانه 5 درجه سانتیگراد



در نهایت از آنجا که در پایان سه هفته نگهداری، شمارش آغازگرهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم در محدوده تعیین شده برای فرآورده‌های پروبیوتیکی باقی‌مانده بود (10^6 –10^7cfu/ml) لذا از آزمون حسی برای تعیین مقبولیت مصرف و پیشنهاد مدت مصرف مناسب برای آنها استفاده گردید که نتایج حاکی از مقبولیت بالای شیرهای بیفیدوس و اسیدوفیلوس در هر سه هفته، بدلیل عدم احساس مزه اسیدی ناشی از آنها (البته مقبولیت شیر بیفیدوس بیشتر از شیر اسیدوفیلوس بود) و مقبولیت پایین شیر اسیدوبیفیدوس بدلیل مزه اسیدی آشکارش بود.

از این رو اگر چنانچه از هیچ طعم‌دهنده‌ای برای پوشاندن این مزه استفاده نگردد، بهترین زمان نگهداری آن را می‌توان هفته اول و نهایتاً هفته دوم پیشنهاد نمود. البته با توجه به نتایج حاصله در این مرحله و عطف به اثر سینرژیستی این دو باکتری بهتر است در مقیاس تولیدی، برای تولید شیر اسیدوبیفیدوس از درصد تلقیح پایین‌تر با حفظ نسبت بکار رفته ، یا از مدت زمان انکوباسیون کمتر استفاده شود.

مطالعه 3 : عنوان پروژه:

بررسی اثر مصرف نوعی ماست پروبیوتیک بر فراسنج‌های لیپیدی سرم افراد مبتلا به هیپرکلسترومی خفیف تا متوسط

واحد همکار: انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور (خانم عطایی – خانم دکتر طاهباز)

هدف **طرح**:

هدف کلی:

- تعیین اثر مصرف ماست پروبیوتیک بر سطح فراسنج‌های لیپیدی افراد مبتلا به هیپرکلسترومی خفیف تا متوسط و مقایسه با اثر مصرف ماست معمولی

اهداف **اختصاصی**:

- تعیین غلظت کلسترول تام، HDL-C ، LDL-C و تری گلیسیرید سرم ناشتا در دوره مصرف ماست پروبیوتیک و معمولی
- تعیین نسبت LDL-C / HDL-C و TC / HDL-C سرم ناشتا در دوره مصرف ماست پروبیوتیک (حاوی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس) و ماست معمولی
- مقایسه شاخص‌های ذکر شده در دوره مصرف ماست پروبیوتیک و معمولی

متدولوژی:

این تحقیق بر روی 14 بیمار شامل 10 زن و 4 مرد انجام شد، در مرحله اول، 7 نفر درگروه مصرف‌کننده ماست معمولی و 7 نفر درگروه مصرف‌کننده ماست پروبیوتیک قرار گرفتند و در مرحله دوم، جابجا شدند. میانگین سن افراد 6/8 ± 50/5 سال بود. سایر مشخصات این افراد در جدول 2 ارائه شده است.

جدول 2 – میانگین و انحراف معیار مشخصات اولیه افراد مورد بررسی در شروع مطالعه (n=14)

شاخص	Mean ± SD
وزن (kg)	۶۷/۷ ± ۷/۸
قد (متر)	۱/۶ ± ۰/۰
BMI (kg/m^2)	۲۶/۱ ±۲/۹
کلسترول تام (mg/dl)	۲۲۰/۰ ± ۲۷/۴
LDL-C (mg/dl)	۱۳۹/۴ ±۳۰/۱
HDL-C (mg/dl)	۴۰/۶ ± ۱۱/۷
تری گلیسیرید (mg/dl)	۲۰۰/۴ ±۷۵/۱

بحث و **نتایج**:

مقایسه تغییرات وزن و BMI و عوامل مداخله‌گر رژیمی، تفاوتی را بین دو دوره مصرف ماست پروبیوتیک نشان نداد.

در دوره مصرف ماست پروبیوتیک، نسبت به دوره مصرف ماست معمولی، سطح کلسترول تام سرم بطور معنی‌داری کاهش یافت (P = 0/049) و مقایسه سایر شاخص‌های چربی خون در این دو دوره، تفاوت معنی‌داری نداشت (جدول 3).

جدول 3 – مقایسه تغییرات سطح شاخص‌های لیپیدی سرم در دوره مصرف ماست معمولی و ماست پروبیوتیک (n=14)

	دوره مصرف ماست معمولی	دوره مصرف ماست پروبیوتیک	نتیجه آزمون paired t-test
Δ کلسترول تام (mg/dl)	+۱۳/۹ ± ۳۹/۷	−۱۲/۳ ± ۹/۹	P =۰/۰۴۹
Δ HDL-C (mg/dl)	+۵/۹ ± ۷/۹	+۰/۵ ± ۵/۸	P =۰/۱۰۶
Δ LDL-C (mg/dl)	+۱۰/۱ ± ۳۸/۱	−۸/۸ ± ۲۰/۱	P =۰/۱۰۶
Δ تری گلیسیرید (mg/dl)	−۱۰/۶ ± ۳۰/۶	−۲۰/۰ ± ۶۰/۵	P =۰/۶۴۲

داده ها بصورت Mean ± SD می باشند.
Δ= تغییرات نسبت به شروع هر دوره

نتایج این پژوهش نشان داد که مصرف ماست پروبیوتیک در مقایسه با ماست معمولی، موجب کاهش معنی‌دار سطح کلسترول تام می‌گردد (P = 0/049) و مقایسه سایر شاخص‌های تحت بررسی، تفاوت معنی‌داری را نشان نداد.

از آنجا که دو باکتری ماست دارای مقاومت اندکی نسبت به نمکهای صفراوی و pH اسیدی معده می‌باشند، در حین گذر از لوله گوارش زنده نمی‌مانند و به همین دلیل، کاهش سطح کلسترول تام سرم به دنبال مصرف ماست پروبیوتیک را می‌توان به وجود دو باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس در آن نسبت داد که در برابر اسید و صفرا مقاومت بالایی داشته و احتمالاً با جذب کلسترول و اسیدهای صفراوی و همچنین دکنژوگه کردن و مهار جذب اسیدهای صفراوی، موجب کاهش سطح کلسترول می‌شوند.

معنی‌دار نبودن کاهش سطح LDL-C در مطالعه حاضر احتمالاً بدلیل کافی نبودن تعداد نمونه بمنظور دستیابی به قدرت آماری مطلوب بوده است. بنابراین احتمال می‌رود که انجام چنین مطالعه‌ای روی تعداد بیشتر ، با کاهش معنی‌دار سطح LDL-C همراه باشد. از سوی دیگر دوز باکتری پروبیوتیک مورد استفاده از اهمیت خاصی برخوردار است. که در مطالعه حاضر ماست پروبیوتیک حاوی حداقل تعداد باکتری‌های پروبیوتیک توصیه شده (10^6 –10^7 cfu/gr) بوده و احتمال می‌رود که با تلقیح دوز بیشتری از کشت آغازگر پروبیوتیک در داخل شیر بمنظور افزایش تعداد این نوع باکتری‌ها، اثر این نوع ماست بر کاهش سطح کلسترول تام و LDL-C بیشتر خواهد بود

مطالعه 4 : عنوان پروژه:

بررسی امکان تولید و نگهداری نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با استفاده از کشت باکتریایی گرمادوست و میاندوست

واحد همکار: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (خانم طاهری – آقای دکتر احسانی)

هدف طرح: هدف کلی:

دستیابی به تکتولوژی و دانش فنی تولید و نگهداری نوعی نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک که علاوه بر داشتن باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) ، در حد قابل قبول، آرومای مورد پذیرش را ایجاد کند.

اهداف **اختصاصی**:

- تعیین بهترین درصد و نوع غنی‌کننده (پودر شیر خشک یا پودر آب پنیر) برای پایه شیر مصرفی
- تعیین بهترین درصد تلقیح برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کالچر ماست
- تعیین بهترین شرایط گرمخانه‌گذاری و انتخاب اپتیمم درجه حرارت رشد
- انتخاب بهترین درصد آب و نمک اضافه شده به دلمه حاصل بمنظور تولید نوشیدنی

متدولوژی:

در این تحقیق عوامل موثر بر رشد و بقاء باکتریایی، اسیدسازی، مقبولیت کلی و پایداری بافتی نوعی نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک، طی تخمیر شش ساعته شیر فرموله شده با استفاده از کشت آغازگر ماست (لاکتوباسیلوس بلگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس) و باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دماهای مختلف و بعد از رقیق‌سازی و هموژنیزاسیون، طی مدت نگهداری بیست و یک روزه محصول در دمای 4 درجه سانتیگراد مورد ارزیابی قرار گرفت. چگونگی تاثیر 5 متغیر (درصد شیر خشک، درصد پودر آب پنیر، نسبت تلقیح آغازگر ماست، تلقیح باکتری پروبیوتیک و دمای گرمخانه‌گذاری) در 3 سطح بر رشد و بقای باکتری پروبیوتیک، مورد بررسی قرار گرفت. 5 متغیر و سطوح مربوطه برای هر یک در جدول 4 آورده شده است.

جدول 4 – متغیرهای مورد بررسی در سه سطح و مقادیر عددی آنها

سطح	شیرخشک بدون‌چربی %w/w	پودر آب پنیر %w/w	کشت آغازگر %w/v	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* %w/v	دما °C
۱	۱۰	۰	۰/۲	۰/۱	۳۷
۲	۱۲	۰/۷۵	۰/۴	۰/۳	۴۰
۳	۱۴	۱/۵	۰/۸	۰/۵	۴۳

بحث و **نتایج**:

سطح بهینه موضعی متغیرها (بهینه در بین سطوح بررسی شده این تحقیق) و میزان عددی هر یک از آنها در رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جدول 5 نشان داده شده است. علاوه بر آن، میزان مشارکت هر متغیر در ایجاد پاسخ نهایی یا شمارش میکروبی نیز در

این جدول محاسبه شده است. طبق نتایج جدول 3 درصد مایه تلقیح ماست، موثرترین متغیر شناخته شد در حالیکه کمترین تاثیر بر رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس درصد تلقیح باکتری پروبیوتیک و دمای گرمخانه‌گذاری بود.

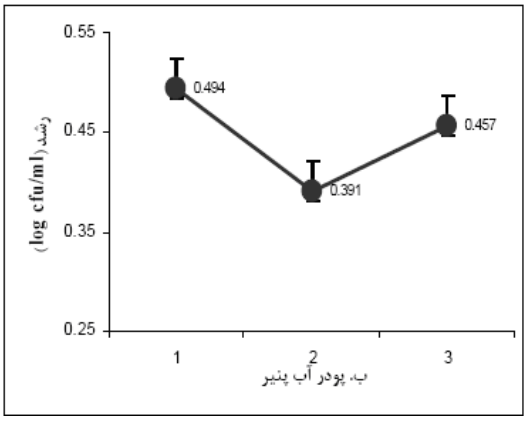
جدول 5 – سطح بهینه و میزان مشارکت تاثیر متغیرهای فیزیکی و شیمیایی بر رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی گرمخانه گذاری

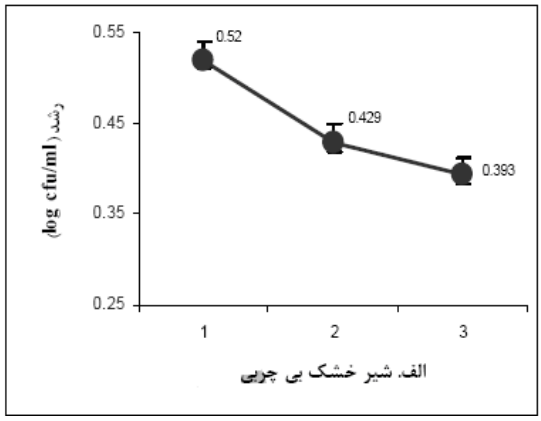
متغیرها	میزان مشارکت (٪)	سطح	مقدار عددی
شیر خشک بی چربی	۲۷/۵۰	۱	۱۰
پودر آب پنیر	۱۷/۶۲	۱	۰
میزان تلقیح *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	۵/۷۴	۱	۰/۱
میزان تلقیح ماست	۳۶/۰۱	۲	۰/۴
دما	۱۳/۰۲	۱	۳۷

نتایج این تحقیق نشان داد که درصد پودر شیر خشک اضافه شده (بمنظور افزایش ماده جامد اولیه شیر) رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را کاهش می‌دهد. این مشاهده را می‌توان به فعالیت پروتئولیتیک محدود باکتری‌های پروبیوتیک و تمایل آنها به پتانسیل اکسیداسیون و احیا کم و شرایط بی‌هوازی نسبت داد. بعبارت دیگر افزایش درصد پودر شیر خشک بدلیل فعالیت پروتئولیتیکی باکتری‌های آغازگر ماست، نوعی شرایط رشد انتخابی برای آنها فراهم می‌کند. (شکل 4)

نتایج بررسی اثر پودر آب پنیر بر رشد و بقای پروبیوتیک‌ها حاکی از کاهش رشد از سطح اول به دوم و افزایش نسبی در پی رسیدن از سطح دوم به سطح سوم بود. افزایش درصد بخش پروتئینی آب پنیر ، عامل اصلی رشد مطلوب لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس است. (شکل 4)

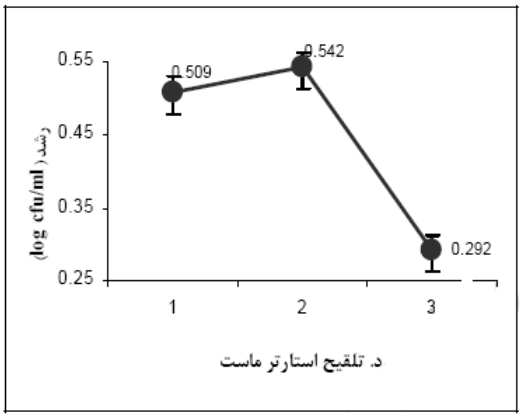
شکل 4 – تاثیر سطوح مختلف شیر خشک بدون چربی و پودر آب پنیر بر شمارش میکربی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی مدت گرمخانه گذاری. سطوح 1 تا 3 هر متغیر مطابق مقادیر تعریف شده در جدول 1 است.

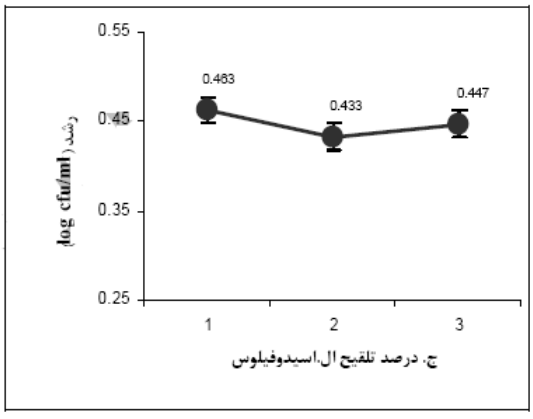


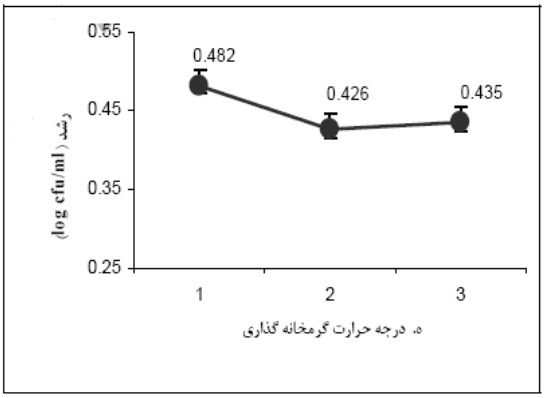


نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که افزایش درصد تلقیح لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر رشد نهایی باکتری تاثیر معنی‌دار ندارد. اما اثر تحریکی میزان تلقیح باکتری‌های ماست بر رشد باکتری پروبیوتیک جالب توجه است. در این تحقیق مشخص شد که افزایش حضور باکتری‌های ماست از سطح اول به دوم (از 2٪ به 4٪) رشد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را افزایش می‌دهد، اما زمانیکه تعداد باکتری‌های ماست از این حد بیشتر شود (از 4٪ به 8٪) افت ناگهانی در رشد باکتری پروبیوتیک مشاهده می‌شود. رشد مطلوب لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در دمای 37 درجه موید خاصیت میانه‌دوستی این باکتری است. (شکل 5)

شکل 5 – تاثیر سطوح مختلف درصد تلقیح لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، میزان تلقیح کشت آغازگر ماست و دمای گرمخانه‌گذاری بر شمارش میکروبی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس طی مدت گرمخانه گذاری. سطوح 1 تا 3 هر متغیر مطابق مقادیر تعریف شده در جدول 1 است.

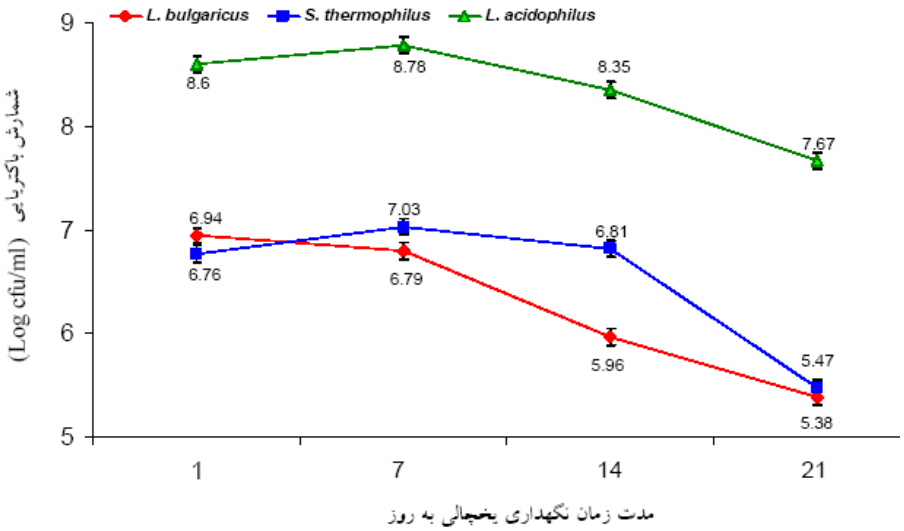




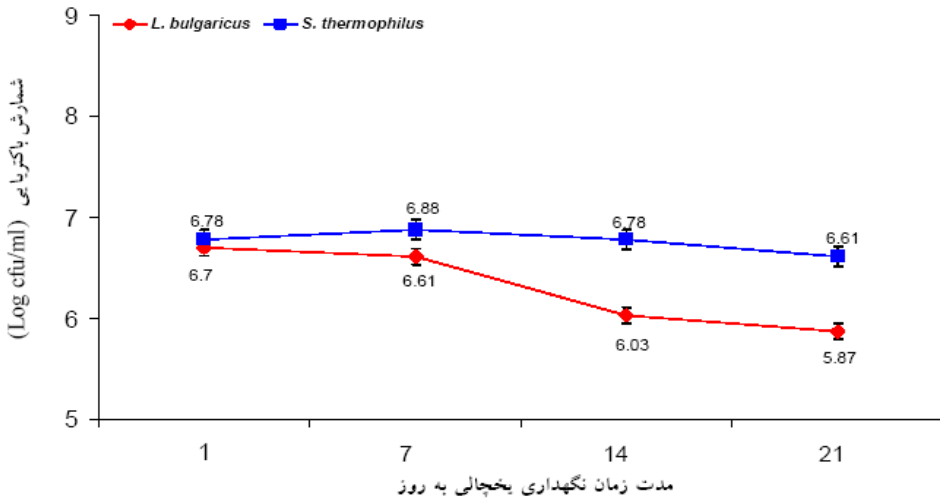


نتایج این تحقیق نشان داد که می‌توان از میکروارگانیسم پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در تولید نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با pH = 4/30 ، درصد نمک 0/8 و ماده جامد کل 7/4 درصد استفاده کرد. به این ترتیب بقای این باکتری طی نگهداری 21 روزه، مناسب ارزیابی شد و محصول توانست با حفظ تعداد باکتری پروبیوتیکی بالاتر از حد تعریف شده، بعد از زمان نگهداری نیز پروبیوتیک باقی بماند. ضمناً این باکتری توانست کاهش تعداد باکتری‌های ماست طی نگهداری را افزایش دهد و افت تعداد میکروبهای ماست در نمونه پروبیوتیک بیش از نمونه شاهد ارزیابی شد. (اشکال 6 و 7)

شکل 6 – تغییرات شمار میکروبی نوشیدنی پروبیوتیک طی دوره نگهداری یخچالی



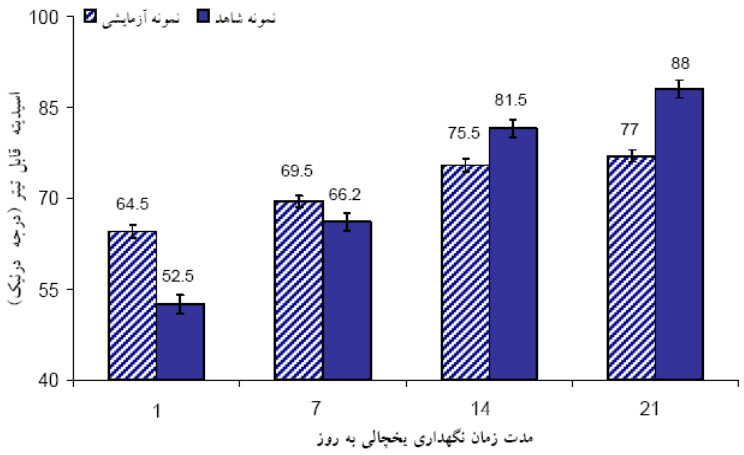
شکل 7 – تغییرات شمار میکروبی نوشیدنی شاهد طی دوره نگهداری یخچالی



لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از نظر حسی و اسیدسازی بعد از تولید، وضعیت بهتری را نسبت به نمونه شاهد ایجاد کرد. درکنار رشد، اسیدسازی باکتری‌های آغازگر طی تولید و نگهداری محصول دارای اهمیت است. در این تحقیق مشخص شد که اسید سازی محصول پروبیوتیک نسبت به شاهد، طی تولید و گرمخانه‌گذاری بیشتر بوده است.

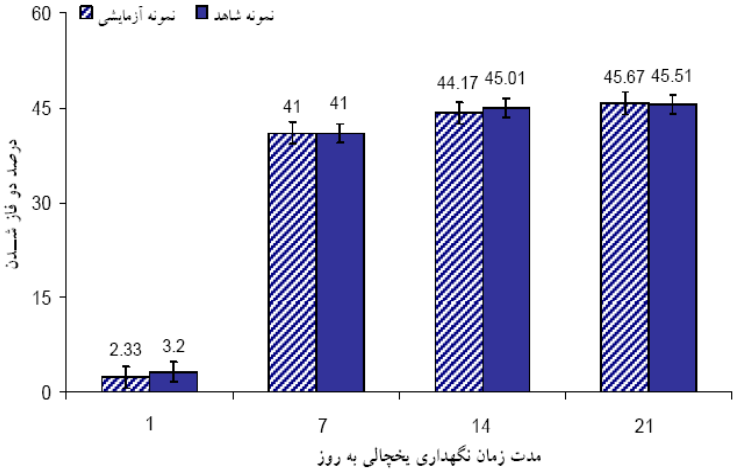
علاوه بر میزان و سرعت اسیدسازی طی تولید که از نظر تکنولوژیک دارای اهمیت است، اسیدسازی حین نگهداری محصول نیز رخ می‌دهد که بالا بودن میزان و سرعت اسیدسازی در این مرحله از مشکلات نگهداری این محصول است. نتایج این مطالعه نشان داد که حضور باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند این پدیده را کاهش دهد و اسیدسازی حین نگهداری تا حدی کنترل شود. (شکل 8)

شکل 8 – تغییرات میزان اسیدیته نوشیدنی پروبیوتیک و نمونه شاهد طی دوره نگهداری یخچالی



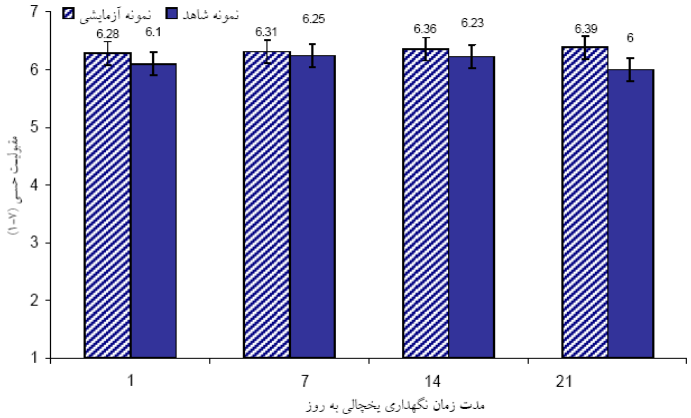
پدیده دو فاز شدن نیز از مشکلات موجود بر سر راه نگهداری این نوع شیرهای تخمیری است، در تحقیق حاضر دو فاز شدن محصول تا روز هفتم افزایش و از روز هفتم تا پایان مدت نگهداری کاهش یافت. این در حالی است که حضور باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در کاهش یا افزایش این پدیده چندان موثر نبود. (شکل 9)

شکل 9 – تغییرات درصد دو فاز شدن نوشیدنی پروبیوتیک و نمونه شاهد طی دوره نگهداری یخچالی



با بررسی نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان برتری نمونه پروبیوتیک با شاهد خود، در روز اول پس از تولید را به اسیدیته بالاتر نمونه ها مربوط دانست (با توجه به شکل 3). میانگین آرای اتخاذ شده نشان می‌دهد که مقبولیت حسی محصول طی مدت نگهداری یخچالی افزایش می‌یابد. این افزایش در مورد محصول پروبیوتیک بیش از نمونه شاهد بود، اما پایین آمدن مقبولیت نمونه شاهد از روز 14 به بعد به موازات افزایش اسیدیته بیش از حد آن می‌تواند نشانگر تاثیر نامطلوب ترشی بالای محصول بر خواص حسی باشد. بنابراین می‌توان گفت که حضور باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر مقبولیت کلی نوشیدنی تاثیر مثبت دارد و طی مدت نگهداری با کنترل اسیدسازی این تاثیر مشهودتر است. (شکل 10)

شکل 10 – میزان مقبولیت نوشیدنی پروبیوتیک و نمونه شاهد طی دوره نگهداری یخچالی



مطالعه 5: عنوان پروژه:

بررسی اثر ریزپوشانی بر زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در بستنی فراویژه

واحد همکار: دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران (آقای همایونی – آقای دکتر احسانی)

هدف **طرح**:

افزایش قابلیت دسترسی زیستی و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک دربستنی غیرتخمیری در طول تولید، نگهداری و مصرف

متدولوژی:

در این تحقیق کشت‌های آغازگر لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس بصورت خالص و خشک شده انجمادی تهیه شده و در محیط کشت MRS Broth در دمای 37 درجه سانتیگراد بمدت 24 ساعت فعال گردیدند. سلول‌های پروبیوتیکی در انتهای فاز رشد لگاریتمی به وسیله سانتریفوژ با 4500 دور در دقیقه، بمدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد جداسازی شده و به دو صورت آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی سین‌بیوتیک غیرتخمیری مورد استفاده قرار گرفتند. برای ریزپوشانی از روش اصلاح شده امولسیون‌سازی استفاده گردید.

بحث و **نتایج**:

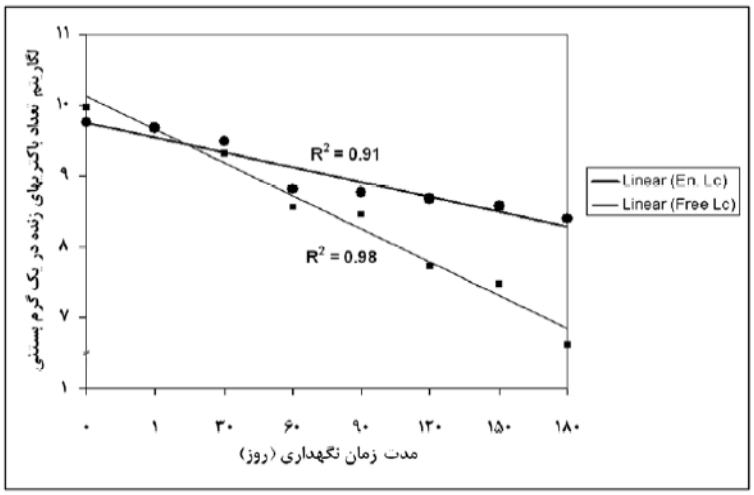
در بخش اول این پژوهش که به انتخاب گونه پروبیوتیکی مقاوم به شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش و بستنی اختصاص داشت، نتایج نشان داد که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در pH اسیدی و قلیایی (2 تا 8)، غلظت‌های مختلف ساکارز (10، 15، 20، 25 درصد) و دماهای پایین نگهداری (4 و 20- درجه سانتیگراد) بستگی به گونه آنها دارد. در مجموع مشخص شد لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس هم از سرعت رشد بالایی برخوردار بوده و هم مقاومت خوبی در pH شبیه‌سازی شده دستگاه گوارشی و شرایط شبیه‌سازی شده بستنی دارند.

نتایج حاصل از بررسی زنده‌مانی این باکتری‌ها پس از سپری شدن شش ماه در بستنی فراویژه، نشان داد که بین گونه باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. یعنی مقاومت گونه‌های باکتریایی در برابر شرایط بستنی متفاوت بود.

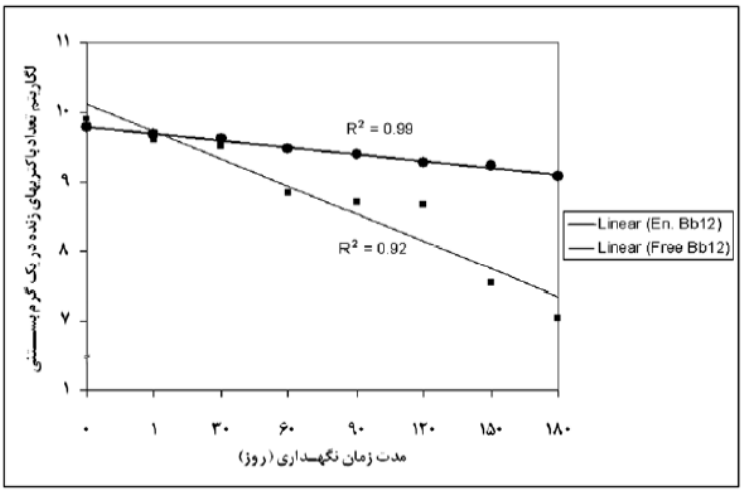
همچنین نتایج نشان داد که باکتری‌های ریزپوشانی شده نسبت به سلول‌های آزاد، بیشتر زنده می‌مانند. همچنین بیفیدوباکتریوم لاکتیس ریزپوشانی شده در بستنی پس از شش ماه نگهداری در 20- درجه سانتیگراد نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی ریزپوشانی شده، زنده می‌ماند.

کاهش تعداد باکتری‌های زنده لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم لاکتیس آزاد و ریزپوشانی شده تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال 5٪ از خود نشان می‌دهد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک به گونه باکتری و حالت آن (آزاد یا داخل دانک) بستگی دارد. بطوری که سلول‌های آزاد پروبیوتیکی نسبت به حالت ریزپوشانی شده با سرعت بیشتری کاهش می‌یابند و شیب نمودار مربوطه تندتر است (اشکال 11و12).

شکل 11 – روند کاهش تعداد سلول‌های لاکتوباسیلوس کازئی آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی فراویژه در طول 180 روز نگهداری در 20- درجه سانتیگراد



شکل 12 – روند کاهش تعداد سلول‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس آزاد و ریزپوشانی شده در بستنی فراویژه در طول 180 روز نگهداری در 20- درجه سانتیگراد



همچنین الگوی کاهش شمار سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس کازئی متفاوت از بیفیدوباکتریوم لاکتیس است. نتایج نشان می‌دهد که سلول‌های بیفیدوباکتریوم لاکتیس در طول نگهداری انباری در دمای 20- درجه سانتیگراد با سرعت بیشتری از بین می‌روند.

این مطالعه نشان داد که افزودن باکتری‌های پروبیوتیک چه به صورت آزاد و چه به صورت ریزپوشانی شده به مخلوط اولیه بستنی بلافاصله قبل از انجماد، روش مناسبی برای تولید بستنی فراویژه است و تغییری در خصوصیات حسی محصول در مقایسه با بستنی معمولی ایجاد نمی‌کند.

از سوی دیگر نشان داده شد که ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها در داخل دانک‌هایی از جنس آلژینات کلسیم و نشاسته مقاوم، زنده‌مانی باکتری‌ها را بطور معنی‌داری افزایش می‌دهد. تعداد پروبیوتیک‌ها در بستنی فراویژه پس از گذشت سه ماه در حدود 10^8 -10^9 cfu/gr بود که به مراتب از میزان توصیه شده از سوی IDF بالاتر است.

مطالعه 6 : عنوان پروژه:

بررسی اثر مصرف ماست پروبیوتیک بر پروفایل لیپیدی و برخی فاکتورهای آنتی‌اکسیدان و التهابی در زنان

واحد همکار: دانشگاه علوم پزشکی تهران (خانم صدرزاده – آقای دکتر جلالی)

هدف طرح:

هدف این طرح مطالعه اثر ماست معمولی و پروبیوتیک بر پروفایل لیپیدی و برخی فاکتورهای آنتی‌اکسیدان (مقایسه میانگین و انحراف معیار متغیرهای وابسته شامل: کلسترول تام، LDL کلسترول، HDL کلسترول، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و ...) در سه گروه و در هر گروه قبل، پس از سه هفته و در انتهای مداخله می‌باشد.

متدولوژی:

این تحقیق بر روی 90 زن با محدوده سنی بین 49- 19 سال بصورت سه گروه مداخله صورت گرفت. افراد بمدت 6 هفته روزانه300 گرم ماست معمولی یا 300 گرم ماست پروبیوتیک (حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم لاکتیس) دریافت کردند و یک گروه نیز بعنوان شاهد هیچ نوع ماستی دریافت نکرد. در هر گروه نمونه های خون افراد در ابتدا، پس از سه هفته و در انتهای مداخله مورد آزمایش قرار گرفت.

بحث و نتایج:

نتایج این تحقیق نشان داد که تغییرات مثبتی در پروفایل لیپیدی دو گروهی که ماست پروبیوتیک و معمولی مصرف کردند ایجاد شد.

میزان کلسترول در هر دو گروه در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت و در گروهی که ماست پروبیوتیک دریافت کرده بودند سطح کلسترول HDH نیز از روند افزایشی برخوردار بود. اختلاف معنی‌داری بین گروهها در سطح کلسترول LDL مشاهده نشد.

همچنین بررسی میانگین و انحراف معیار آنزیم های سوپراکساید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز، نشان داد که اگرچه در ابتدا تفاوت معنی داری در سطح کاتالاز دو گروه مشاهده نمی شد ولی پس از مداخله مقدار این آنزیم در گروهی که ماست پروبیوتیک مصرف کردند بمیزان قابل توجهی بیش از گروهی بود که ماست معمولی دریافت کردند. در عین حال در هر دو گروه نیز مقدار (SOD) بعد از مداخله به میزان زیادی افزایش نشان داد. بنابر نتایج بدست آمده مشخص شد که مصرف ماست پروبیوتیک باعث افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، و به تبع آن کاهش استرس اکسیداتیو می‌گردد.

پروژه‌های در دست اجرا:

- **عنوان پروژه:** بهینه‌سازی شرایط تولید ماست پروبیوتیک غنی‌شده با فیتواسترولها

واحد همکار: دانشگاه ارومیه (خانم پارسا – آقای دکتر علیزاده)

- **عنوان پروژه:** اثر دریافت ماست پروبیوتیک بر قند خون، الگوی لیپیدی، شاخص‌های استرس اکسیداتیو و فاکتور التهابی در بیماران مبتلا به دیابت نوع 2

واحد همکار: دانشگاه علوم پزشکی تبریز (خانم اجتهد – آقای دکتر مهتدی‌نیا و آقای دکتر همایونی)

- **عنوان پروژه:** بررسی پتانسیل پروبیوتیکی پنیر یواف فتا بوسیله افزودن کشتهای آغازگر همراه و تغییرات فیزیکوشیمیایی، رئولوژی، میکروبی و حسی آن در طی فرایند و نگهداری

واحد همکار: دانشگاه تهران (آقای اکبریان – آقای دکتر رضوی و آقای دکتر احسانی)

- **عنوان پروژه:** بررسی اثر پری‌بیوتیکی اولیگوساکاریدهای موجود در آب هویج و شیر هیدرولیز شده آنزیمی بر رشد و بقاء برخی سویه‌های پروبیوتیک در نوشیدنی شیر/آب هویج

واحد همکار: دانشگاه تهران (آقای دانشی – آقای دکتر احسانی و آقای دکتر رضوی)

- **عنوان پروژه:** تولید شیر سین‌بیوتیک با استفاده از اینولین، فروکتوالیگوساکاریدها و ...

واحد همکار: دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (خانم محسنی – آقای دکتر احسانی)

- **عنوان پروژه:** میکروکپسوله کردن پروبیوتیک‌ها در فرآورده‌های پودری

واحد همکار: دانشگاه الزهرا (خانم یاری – خانم دکتر علوی)

سلامت و فرآورده های لبنی سنتی ایرانی

مریم تاج آبادی ابراهیمی، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

میترا حیدری نصرآبادی استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

پروانه جعفری استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارک

مقدمه:

ایده اولیه میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک‌اولین بار در سال 1908 توسط دانشمند روسی و برنده نوبل، ایلیا ایلیچ مچنیکف یا همان الی مچنیکف، پدر دانش پروبیوتیک، ارائه شد. .البته واژه پروبیوتیک به معنی زندگی‌بخش تا سال 1965 یعنی تا 49 سال بعد از مرگ مچنیکف هرگز به کار برده نشد. مچنیکف مدعی نوعی ارتباط بین مصرف منظم فرآورده های تخمیری شیر و سلامت و طول عمر جمعیت‌های بومی اروپای شرقی بویژه بلغارها شد .او کتابی تحت عنوان "زندگی طولانی " نگاشت و در آن این فرضیه را مطرح کرد که برخی باکتر یهای روده ای با تولید مواد سمی مظنون اصلی فرآیند پیری در انسان هستند .او معتقد بودعدم تعادل در جمعیت باکتریایی مقیم روده بزرگ انسان مواد سمی تولید می کنند که بر سیستم عصبی و عروقی میزبان تأثیرگذار است و در ضمن جذب و گردش این مواد در جریان گردش خون بر روند پیری نقش دارد.

بر اساس تعریف سازمان جهانی غذا وکشاورزی (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال 2001 "پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که تجویز مقادیر کافی آن موجب بروز اثرات مفید بر سلامت میزبان خواهد بود". براساس این تعریف سه عامل زنده‌بودن میکروارگانیسم، تجویز به مقدار کافی و ایجاد حداقل یک اثر مفید سه شرط لازم برای انتخاب میکروب پروبیوتیک هستند.

اگرچه بیشتر پروبیوتیک‌های مورد استفاده در انسان از خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. اما این امر نباید منجر به این خطا شود که هر باکتری از این گروه یک پروبیوتیک است چراکه توانایی بقاء در برابر استرس های سیستم گوارشی، اثرات مفید و خصوصیات بیوشیمیایی این باکتری‌ها در حد سویه متفاوت بوده و حتی در سویه‌های یک گونه خصوصیات عملکردی متفاوت دیده می‌شود.

ایران کشوری با موقعیت جغرافیایی گسترده، تنوع آب و هوایی زیاد و اکوسیستم‌های گوناگون است. ایران در گروه کشورهای دارنده غنی ترین تنوع وضعیت آب و هوایی در جهان است. به حدی که از مجموع ۱۴ تنوع آب و هوای دنیا، سرزمین ایران برخوردار از ۱۱تنوع آن است. نتیجه این تنوع در نحوه زندگی و سیستم تغذیه‌ای بومی محلی قابل روئیت است.

سیستم تغذیه سنتی ایرانی که در روستاها ریشه دارد، امروزه سرمشق بسیاری از تولید کنندگان مواد غذایی و محققان غذای بیو و سالم جهان است. اگرچه عواملی متعددی دربرتری سلامت روستاییان نسبت به شهرنشینان دخالت دارد. اما بررسی سیستم تغذیه‌ای روستاییان

که بدون شک یکی از علل برتری سلامت این افراد است می‌توان راهکاری مناسب جهت تصحیح و ارتقاء تغذیه شهری و بهبود سطح سلامت جامعه شهری باشد.

سالهاست که اهمیت مصرف محصولات لبنی در سلامت انسان به اثبات رسیده است. اما امروزه مطالعات زیادی جهت افزودن باکتری های پروبیوتیک به محصولات لبنی و بررسی تاثیر این باکتری ها روی سلامت مصرف کننده صورت می گیرد. یکی از مشکلات بکار گیری باکتری های پروبیوتیک در محصولات لبنی عدم تحمل شرایط اکولوژیکی محصول و از بین رفتن باکتری پروبیوتیک در این محصولات می باشد. همچنین ایجاد طعم و عطر نامطلوب توسط باکتری پروبیوتیک در این محصولات مشکل دیگری است که تولید کنندگان محصولات لبنی با آن روبرو هستند. ازاین‌رو جدا سازی باکتری پروبیوتیک از محصول لبنی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتری پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی جهت تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که بطور طبیعی حاوی باکتری پروبیوتیک هستند به ما عرضه دارد. از سوی دیگر انتخاب محصول لبنی صنعتی مشابه منشاء جدا سازی پروبیوتیک می تواند گامی مناسب برای کاهش مشکلات افزودن باکتری پروبیوتیک به محصول لبنی باشد. تا کنون گونه های مختلفی از جنسهای لاکتوباسیلوس لاکتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم بعنوان پروبیوتیک معرفی شده اند، اما بیشتر پروبیوتیکهای معرفی شده مربوط به جنس لاکتوباسیلوس می باشند.

هدف این تحقیق جداسازی، شناسایی ملکولی و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی (اندازه گیری میزان بقاء در سیستم گوارشی، توانایی اتصال به سلول‌های اپتلیال روده، تولید ترکیبات ضد میکروبی، مهار اتصال باکتری‌های بیماریزا، توانایی کاهش کلسترول و ترمیم زخم‌های پوستی و گوارشی) لاکتوباسیل‌های جدا شده از انواع محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران در شرایط *in vitro* و *in vivo* است.

مواد و روش‌ها؛ جمع‌آوری نمونه‌ها

نمونه های لبنی سنتی از کارگاه‌های سنتی تولید کننده فرآورده‌های لبنی از استان‌های آذربایجان، سمنان، کرمانشاه و بابل تهیه گردید. نمونه‌ها طی 24 ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. در تمام مدت انتقال نمونه ها در دمای 4 درجه سانتیگراد محافظت شدند. این نمونه ها شامل ماست و دوغ و کره و پنیرو کشک بودند. در مجموع 46 نمونه به آزمایشگاه منتقل شد.

غربال انتخابی سویه های لاکتوباسیل متحمل اسید

فرآورده های لبنی دارای تنوع میکروبی بسیار غنی می باشند وجداسازی تک تک باکتریها از این محصولات بسیار وقت گیر است. ازاین‌رو با اسیدی کردن محیط تا حدود زیادی سویه های غیر مقاوم به اسید حذف شد. در نهایت کلنی های رشد کرده روی محیط MRS agar پس از 3تا 5 بار کشت خطی خالص گردیدند. نمونه‌های خالص شده از نظر واکنش گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله‌های میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی جنس *Lactobacilli* spp شناخته و در زیر 30٪ گلیسرول در دمای80 – درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

بررسی میزان تحمل اسید و صفرای سویه های ایزوله شده

بعد از 2 ساعت تیمار اسیدی (pH=2/5) و تیمار خنثی (pH=6/5)، از هر نمونه سریال رقت تهیه و تعیین جمعیت صورت گرفت. نتایج جهت تعیین تاثیر محیط اسیدی در کاهش جمعیت سویه های جداسازی شده گروه بندی و مقایسه شدند. گروه‌های مقاوم برای بررسی بیشتر و آزمون های بعدی انتخاب شدند.

سویه های مقاوم به اسید انتخاب شده از مرحله اول به محیط MRS broth حاوی 0/3٪ نمک‌های صفراوی (oxgall) تلقیح شد. همچنین تلقیح مشابهی به محیط MRS broth فاقد نمک های صفراوی بعنوان شاهد صورت گرفت. بعد از تلقیح تا 8 ساعت هر 30 دقیقه و بعد از 24 ساعت، میزان جذب نوری نمونه ها در طول موج 600 نانومتر تعیین شد. تفاوت زمانی بر اساس دقیقه بین افزایش کدورت 0/3 واحدی در دو محیط مذکور بعنوان زمان تاخیر رشد تعیین شد.

شناسایی بیوشیمیایی سویه های برتر باکتریایی

سویه‌های مقاوم به اسید و املاح صفراوی انتخاب شده از مرحله قبل بر اساس صفات شکلی و بیوشیمیایی مانند توانایی رشد در دماهای 15 و 45 درجه سانتیگراد، تولید اسید و گاز از گلوکز، تخمیر قند های مختلف و تولید NH_3 از آرژنین بر اساس کتاب برگی شناسایی شدند.

اتصال باکتری‌های پروبیوتیک:

جهت ارزیابی اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده از لاین سلولی Caco-2 استفاده شد. این سلول‌ها در محیط کشت Dulbeco`s modified eagle`s, minimal essential medium کشت داده شدند. جهت بررسی اتصال 1×10^5 سلولCaco-2 در یک میلی لیتر محیط کشت سلول به هر چاهک اسلاید چمبر تلقیح شد. بعد از 24 ساعت به هر چاهک 300 µl بافر فسفات و لاکتوباسیل به غلظت 10^8-10^9CFU/mlاضافه شد. بعد از 90 دقیقه گرمخانه گذاری همراه با تکان آرام باکتری‌های. متصل شده با دو روش رنگ آمیزی و کشت در محیط اختصاصی شمارش شدند. در این بررسی شاهد مثبت سویه تجاری La-5 و شاهد منفی چاهک بدون اضافه کردن لاکتوباسیل در نظر گرفته شد.

جایگزینی باکتری‌های بیماریزا با باکتری‌های پروبیوتیک

به دنبال اتصال لاکتوباسیل‌های مورد بررسی به هر چاهک 300 µl بافر فسفات و باکتری‌های بیماریزا به غلظت 10^8 CFU/ml- 10^9اضافه شد. بعد از بعد از 60 دقیقه گرمخانه گذاری همراه با تکان آرام سلول‌ها باکتری‌های. متصل نشده حذف و باکتری‌های بیماریزا با دو روش رنگ آمیزی گرم و کشت در محیط اختصاصی شمارش شدند.

ارزیابی تولید ترکیبات ضد میکروبی

ارزیابی تولید ترکیبات ضد میکروبی لاکتوباسیل‌های مورد بررسی با دو روش دو لایه و حفره‌ای علیه باکتری‌های بیماریزای اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس یرسینیا انتروکولیتیکا, لیستریا اینوکوا و لیستریا مونوسایتوژنز صورت گرفت.

شناسایی ژنتیکی

به منظور شناسایی قطعی سویه باکتریایی از روش شناسایی ژنتیکی 16S rDNA استفاده شد.استخراج DNA از کشت 24 ساعت سویه‌های منتخب طبق پروتکل ولینگتون (2003) انجام شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده توسط شرکت MWG انجام شد ترادف قطعات تعیین توالی شده در بانک اطلاعاتی BLAST مورد مقایسه قرار گرفت.

بررسی میزان جذب کلسترول

جهت بررسی میزان جذب کلسترول از روش o-phthalaldehyde استفاده شد .به این منظور جذب نوری در طول موج 550 نانومتر بررسی شد[15]. بین کلسترول باقی مانده در محیط کشت و افزایش کدورت محیط ارتباط خطی وجود دارد. برای تعیین میزان کلسترول باقی مانده در محیط کشت از فرمول $M_1 = OD_S . M_0/OD_C$ استفاده گردید.

بررسی اثر سویه‌های منتخب در حیوانات آزمایشگاهی

- اثر تجویز خوراکی این باکتریها بر پروفایل لیپید و آنزیم های کبدی در موش های رت نر بالغ طبیعی و هیپرکلسترومی

تعداد28 سر موش رت نژاد ویستار 4گروه تجربی شامل گروه تجربی 1 ، گروه تجربی 2 ، و گروه تجربی 3 وگروه کنترل تقسیم شدند. در روز اول همه موش ها وزن کشی شده و به کلیه گروهها با سرنگ مخصوص گاواژ رت به ترتیب مقدار 2میلی لیتر skim milk (در گروه کنترل)، skim milk بهمراه لاکتوباسیل های مورد نظر.(گروههای تجربی 1و2و3) داده شداین تیمار به مدت 3 هفته هر روز تکرار گردید. پس از طی دوره موش ها وزن کشی و بیهوش شده و با بازکردن قفسه‌ی سینه خونگیری مستقیم از قلب انجام گرفت. همچنین در روز 1 و 21 آزمایش مقدار یک گرم مدفوع تازه از هر موش جمع آوری شد و جهت آزمایشهای شمارش باکتریهای مدفوع مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه های سرم جهت بررسی میزان کلسترول توتال LDL و HDL و تری گلیسیرید به آزمایشگاه فرستاده شد.کلیه این آزمایش ها در هر دو موش های طبیعی و هیپرکلسترومی انجام شد. بررسی های آماری نشان داد این باکتریها توانستند میزان کلسترول و تری گلیسرید های خون را تغییر وکاهش دهند.

پروبیوتیک ها واثر آنها در ترمیم زخم‌های پوستی و گوارشی

برای بررسی اثرات باکتریهای پروبیوتیک بدست آمده از مطالعات قبلی برترمیم زخم های معده و پوستی از رت‌های نربالغ استفاده گردید. زخم گوارشی توسط القای لومینال محلول اسید استیک ایجاد شد. یک روز پس از القای زخم ، رت‌ها تا روزهای سوم ، پنجم وهفتم از طریق گاواژ دهانی با پروبیوتیک مورد بررسی تغذیه شدند. در نهایت اندازه زخم از نظر تعداد فیبروبلاست ، نوتروفیل ، کلاژن ، ماکروفاژ و گلبول سفید در واحد سطح پس از تغذیه با پروبیوتیک و گروه کنترل بررسی و مقایسه شدند. در بررسی ترمیم زخم پوستی برشی در پشت موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار که شامل گروه‌های تجربی، کنترل و کنترل منفی هستند، ایجاد شد. دو گروه کنترل و تجربی به ترتیب تحت درمان موضعی با اوسرین و اوسرین حاوی لاکتوباسیلوس برویس قرار گرفتند اما گروه کنترل منفی درمانی دریافت نکردند. مساحت زخم هر 3 روز یکبار اندازه‌گیری شد. زخم پوستی موش‌ها به ترتیب پس از کشته شدن در روزهای 1، 7 و 21 برداشته و تحت مطالعات بافت‌شناسی و آماری قرار گرفت.

نتایج

غربال انتخابی سویه‌های تحمل کننده اسید و املاح صفراوی:

از میان 46 نمونه محصول لبنی مورد آزمایش در مجموع 69 ایزوله تحمل کننده اسید و املاح صفراوی جدا گردید. ایزوله‌های خالص شده از نظر واکنش گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند. باسیل های گرم مثبت و کاتالاز منفی از جنس لاکتوباسیلوس شناسایی و بر اساس منشاء نمونه و مورفولوژی کلنی کدگذاری گردیدند. پس از بررسی‌های تکمیلی و اندازه‌گیری میزان مقاومت در شرایط اسیدی و املاح صفراوی 22 سویه لاکتوباسیل مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی (بالقوه پروبیوتیک) انتخاب شد. در این تحقیق اسیدی کردن محیط تا حدود زیادی سویه های غیر پروبیوتیکی را حذف نمود. از سوی دیگر سانتریفیوژ نمونه ها بعد از مرحله غنی سازی و تیمار اسیدی احتمال از دست دادن سویه های مقاوم به اسید را کاهش داد.

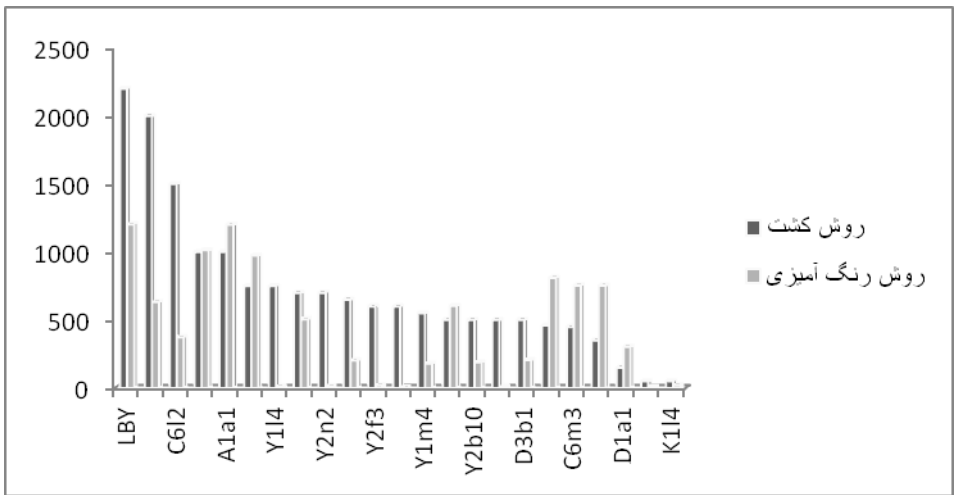
در رروش دولایه بر اساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در مرکز پلیت، لاکتوباسیل ها از نظر توانایی کاهش رشد باکتری‌های اندیکاتور تقسیم‌بندی شدند. بر اساس درصد بازدارندگی لاکتوباسیل‌های مورد مطالعه در سه گروه بازدارنده (درصد بازدارندگی بالای 75٪)، نیمه بازدارنده (درصد بازدارندگی بین 75٪–40٪) و غیر بازدارنده (درصد بازدارندگی کمتر از 40٪) گروه‌بندی شدند.

در روش حفره ای پس از تلقیح عصاره‌های خنثی و اسیدی به چاهک‌های محیط های کشت اندیکاتور و 24 ساعت گرمخانه گذاری در شرایط اپتیمم نتایج بر اساس قطر هاله ایجاد شده در اطراف چاهک (بر حسب mm) گزارش شد. اطراف چاهک های حاوی عصاره اسیدی برخی سویه‌ها هاله عدم رشد مشاهده گردید.در حالیکه تنها در اطراف چاهک حاوی عصاره خنثی تنها یک سویه در محیط حاوی لیستریا مونوسایتوژنز، هاله دیده شد.

توانایی جذب کلسترول توسط این سویه‌ها بین 54–266 µg/ml یا (88/8٪– 18٪) متغیر بود. نتایج نشان می دهد که سویه‌های با جذب کلسترول بالای 200 µg/ml از بهترین سویه های پروبیوتیک جهت کاهش جذب کلسترول در این مطالعه می‌باشند. که در مقایسه با سویه های تجاری از میزان جذب نسبتا بالاتری برخوردار هستند. ترادف ناحیه 16S rDNA ایزوله‌های که بالاترین اثرات ضدمیکروبی و توانایی کاهش کلسترول را داشتند با سایر باکتری‌ها در بانک اطلاعاتی BLAST مقایسه گردید. و نتایج آن در این بانک ثبت گردید.

نمودار1 مقایسه متوسط نتایج حاصل از بررسی اتصال لاکتوباسیل‌ها با دو روش رنگ‌آمیزی و کشت در محیط اختصاصی را نشان می دهد این نتایج نشان می دهد روش رنگ‌آمیزی روش موثقی جهت بررسی توانایی اتصال باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت سلولی نمی‌باشد و روش کشت از اطمینان بیشتری نسبت به روش رنگ‌آمیزی برخوردار است. از سوی دیگر مقایسه تولید ترکیبات ضد میکروبی و توانایی جایگزینی باکتری‌های بیماریزا موید این مهم است که مهار و کنترل رشد باکتری‌های بیماریزا در سویه‌های مختلف لاکتوباسیل (حتی در یک گونه) متفاوت بوده و ممکن است با هر یک از سه روش مذکور صورت پذیرد. هیچ ارتباط معنی داری بین تولید ترکیبات و جایگزینی رقابتی سویه‌های مورد بررسی مشاهده نشد.

نمودار1- مقایسه متوسط نتایج حاصل از بررسی اتصال لاکتوباسیل‌ها با دو روش رنگ‌آمیزی و کشت در محیط اختصاصی



پس از بررسی آماری نتایج آزمایش های انجام شده در موش های طبیعی و موش های هیپرکلسترومی می توان نتیجه گرفت که این باکتریها توانستند میزان کلسترول و تری گلیسرید های خون را تغییر وکاهش دهند . بررسی‌های اثر ترمیم زخم نشان داد درصد بهبودی زخم و التهاب در گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل وکنترل منفی دارای اختلاف معناداری بود. یافته‌های پاتولوژیک در بررسی نمونه های اخذ شده از موارد تجربی، کنترل و کنترل منفی، از نظر هیستولوژیک، حکایت از روند کیفی نسبتا مشابه از نظر سرعت روند ترمیم و پاکسازی ناحیه ترمیم زخم با توجه به توالی زمانی نمونه‌ها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین‌داشتند. یافته‌های فوق نشان دادند که لاکتوباسیلوس‌های مورد بررسی به طور معناداری روند بهبود زخم پوستی و گوارشی در موش صحرایی را افزایش داد.

بحث و نتیجه گیری:

تنوع میکروبی در محصولات لبنی بسیار وسیع است. ازاین‌رو بررسی میکروفلور این فرآورده‌ها با مشکلات فراوانی همراه است. روش غربالگری مستقیم با ممانعت از رشد باکتری های حساس به اسید می تواند روشی مناسب برای جداسازی سویه های دارای پتانسیل پروبیوتیکی باشد و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی محصولات لبنی را ساده تر سازد. در این بررسی از 46 نمونه مختلف محصول لبنی تخمیری سنتی 22 سویه لاکتوباسیل خالص سازی شد که نسبت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی سیستم گوارش مقاوم هستند.

بررسی تولید ترکیبات ضد میکروبی نشان میدهد در روش دولایه تمامی سویه‌ها تا حدودی توانایی مهار رشد باکتریهای بیماریزا را نشان دادند و درصد بازدارندگی رشد این سویه ها بین 20٪ –100٪ متغییر بود. از سوی دیگر، این باکتریها جلوی رشد باکتریهای گرم مثبت را بهتر از باکتریهای گرم منفی می‌گیرند. این نتایج نشان می‌دهد، مواد شبه باکتریوسین تولیدی لاکتوباسیل‌های مورد بررسی طیف اثر وسیعی داشتند و برخلاف باکتریوسین‌های تولیدی از باکتریهای گرم منفی روی هر دو گروه باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی اثر می‌گذارند. این نتیجه با نتایجی که کالچایاناند و بالکبورن (1989و1992) گزارش کرده‌اند مطابقت دارد.

در روش حفره‌ای، عصاره اسیدی تعداد معدودی از سویه‌ها موجب مهار رشد برخی از باکتریهای بیماریزا شدند. از سوی دیگر در این روش با استفاده از عصاره خنثی تنها یک سویه توانایی مهار رشد لیستریا مونوسایتوژنز را داشت. از آنجا که در روش حفره‌ای عصاره بسیاری از سویه ها حتی بدون تنظیم pH ایجاد هاله عدم رشد روی محیط آگار ننمود. عدم توانایی مهار رشد باکتریهای اندیکاتور در روش حفره ای را می توان به وابستگی ترکیبات شبه باکتریوسین به غشاء باکتری اسید لاکتیک نسبت داد. توره و همکارانش(2003) عدم تطابق نتایج بررسی تولید ترکیبات ضد میکروبی با دو روش دو لایه و حفره‌ای را به مقدار جزئی عصاره نسبت دادند. از سوی دیگر حدس زده می شود تماس مستقیم دو سلول (اندیکاتور و سلول تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی) موجب تحریک سنتز و ترشح ترکیبات ضد میکروبی می‌شود . همچنین در گزارشات دیگر طیف اثر ضد میکروبی لاکتوباسیل‌ها وابسته به pH اعلام شده است، بسیاری از باکتریوسین‌ها به دلیل ساختار کاتیونیک فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری در pH های اسیدی (کمتر از 5) نشان می‌دهند از سوی دیگر ترکیبات شبه باکتریوسین تولیدی توسط باکتریهای اسید لاکتیک پروتئینی می باشند و تغییرات pH میتواند روی ساختار و طیف ضدمیکروبی این ترکیبات اثرگذار باشد.

در مطالعه برومبرگ و همکارانش (2004) 61٪ از باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از فرآورده‌های تخمیری گوشتی فعالیت ضد میکروبی در آزمون ساندویچی (روشی مشابه روش دو لایه) نشان دادند و از این تعداد تنها 31٪ در روش حفره‌ای توانایی ممانعت از رشد باکتریهای اندیکاتور را روی محیط آگار داشتند. در بررسی مشابهی لوک و اشلینگر سویه های مختلف لاکتوباسیلوس ساکی را نظر توانایی مهار رشد باکتریهای بیماریزا با دو روش دولایه و حفره‌ای مورد بررسی قرار دادند. از سویه‌های که توانایی مهار رشد باکتریهای اندیکاتور را در روش دولایه داشتند هیچکدام در روش حفرهای ایجاد هاله عدم رشد ننمودند. پس از افزایش غلظت مایع‌رویی (vac-speed 6) سویه از 19 سویه مورد بررسی روی محیط آگار ایجاد هاله عدم رشد نمودند.

مقایسه نتایج بدست آمده در این بررسی با نتایج گزارش شده نشان می‌دهد، باکتری‌های اسید لاکتیک دارای طیف ضد میکروبی وسیعتری نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشند و در غربال باکتریهای اسید لاکتیک دارای فعالیت ضد میکروبی باید از طیف وسیعی از باکتریهای اندیکاتور استفاده نمود. از سوی دیگر روش دو لایه روشی مناسب برای بررسی توانایی مهار باکتریهای اندیکاتور توسط باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط محیطی است. چراکه این باکتریها در تماس مستقیم (مشابه شرایط محیطی مثلا روده انسان یا محیط غذایی غیر استریل)توانسته اند جلوی رشد باکتریهای اندیکاتور را بگیرند، همچنین روش حفره‌ای به دلیل مقدار جزئی عصاره مورد بررسی، تغییر pH عصاره و عدم تماس مستقیم سلول اندیکاتور و سویه مورد آزمون میتواند موجب حذف سویه دارای پتانسیل ضد میکروبی شود.

لاکتوباسیل‌ها در زیر میکروسکوپ غیر متحرک، بدون اسپور، گرم مثبت و میله‌ای بلند تا کورینه‌فورم می‌باشند. البته بسیاری از جنس‌ها چنین خصوصیات فنوتیپی را نشان می‌دهند. در این جا می‌توان با تست های ساده‌ای مثل تحمل اکسیژن، کاتالاز منفی و توانایی رشد روی محیط کشت اسیدی MRS جنس لاکتوباسیل را شناسایی کرد.

تست‌های فنوتیپیک کلاسیک شناسایی گونه های جنس لاکتوباسیل‌بر خصوصیات بیوشیمیایی مانند تخمیر جور و یا نا جور، تولید ایزومرهای اسید لاکتیک متابولیسم سوبستراهای کربوهیدرات، کوآگولاسیون شیر، تولید برخی آنزیم‌ها و حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی استوار است. لاکتوباسیل‌ها عموماً شیمیوارگانوتروف هستند و کربوهیدرات‌ها را تخمیر و تولید اسید لاکتیک می‌کنند. اگر چه شناسایی لاکتوباسیل‌ها در حد گونه به علت تغییرات زیاد خصوصیات بیوشمیایی (الگوی تخمیر) مشکل می‌باشد. به همین علت است که شاهد دسته بندی‌های گروهی می‌باشیم، به طور مثال گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم که شامل زیر گونه های لاکتوباسیلوس پنتوزوس، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم، لاکتوباسیلوس پلانتاروم است.

نواحی 23S rDNA و 16S rDNAنواحی حفظ شده و بسیار کم تغییری در گونه‌های مختلف پروکاریوتی نسبت به نواحی دیگر کروموزومی می‌باشند، و خاص هر گونه هستند. پرایمرهای 616V و 630R به طور گسترده‌ای در بررسی و آنالیز ناحیه 16 S rDNA باکتری‌های اسید لاکتیک در محصولات لبنی استفاده می‌شود. تکثیر، توالی یابی و مقایسه این ناحیه روشی مورد قبول برای شناسایی باکتری‌ها و یا بررسی تغییرات جمعیتی در طی پروسه تخمیر است.عدم تطابق نتاج به دست آمده از شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی در این آزمون نشان می‌دهد، آزمون‌های بیوشیمیایی روش مناسبی برای شناسایی لاکتوباسیل‌ها نمی‌باشد. و شناسایی گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها بر اساس توالی ناحیه16 S rDNA روش مناسبی است. این نتایج با نتایجی که پناچیا و همکاران (2004) و آنوک و همکاران (2003) به‌دست آورده‌اند تطابق داشت.

بررسی کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده انسان و حیوان با محدودیت هایی مواجه است. از این رو جهت بررسی توانایی کلونیزاسیون باکتری های پروبیوتیک در روده از سلول های کشت بافت و موکوس جدا شده از روده بعنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می شود. در این بررسی‌ها معمولا از لاین کشت سلولی Caco-2 و HT-29 و لاین سلولی تولید کننده موکوس HT-20MTX استفاده می شود.

در روش رنگ‌آمیزی سویه‌های مورد بررسی بر اساس متوسط تعداد لاکتوباسیل‌های متصل در سه گروه ضعیف متوسط و قوی قرار گرفتند. در این بررسی‌بعنوان شاهد مثبت از سویه تجاری La-5 استفاده شد. سویه‌های Aa1 و Y2l6 مشابه سویه تجاری La-5 با متوسط تعداد لاکتوباسیل بالای 1000بیشترین توانایی اتصال را نشان دادند.

نتایج اتصال سویه‌های لاکتوباسیل به سلول های کشت Caco-2 با روش کشت متفاوت از نتایج بدست آمده ار روش رنگ‌آمیزی بود. در روش کشت بر اساس کلنی های رشد کرده روی محیط انتخابی اتصال قوی را نشان دادند. بررسی میکروسکوپی این سویه‌ها نشان داد اندازه کوچک این باکتری‌ها در مقابل سلول‌های Caco-2 موجب خطای دید و عدم شمارش این باکتری‌ها در روش رنگ آمیزی بوده است. لذا به نظر می‌رسد روش رنگ‌آمیزی روش موثقی جهت بررسی توانایی اتصال باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت سلولی نمی‌باشد و روش کشت از اطمینان بیشتری نسبت به روش رنگ‌آمیزی برخوردار است. در مطالعه مشابهی که Gilles Chauviere و همکاران در سال (1992) روی بررسی اتصال 25 سویه‌لاکتوباسیل‌های جدا شده از مدفوع انسان و حیوانات به سلول‌های کشت Caco-2 داشتند نشان دادند، 7 سویه بخوبی به سلول‌های کشت متصل شد که اغلب از مدفوع انسان جدا شده‌بودند. در این بررسی از روش رنگ‌آمیزی گرم به‌منظور شمارش باکتری های متصل استفاده شد. و باکتری‌های متصل در 20 زمینه میکروسکوپی شمارش و بصورت باکتری های متصل به 100 سلول Caco-2گزارش شدند.

نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد توانایی اتصال حتی در یک گونه از جنس لاکتوباسیلوس متغییر و وابسته یه سویه است. این نتایج اهمیت بررسی توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش در شرایط *invitro* به منظور انتخاب سویه های پروبیوتیک را تائید می‌کند.

مطالعات نشان داده است بررسی توانایی اتصال به سلول های کشت در شرایط *in vitro* پیش بینی مناسبی برای امکان اتصال در روده انسان در شرایط *in vivo* است. مقایسه ارزیابی نتایج بدست آمده در آزمون اتصال لاکتوباسیل‌های بومی ایران با دو روش رنگ‌آمیزی و کشت نشان می‌دهد روش کشت از اطمینان بیشتری نسبت به روش رنگ‌آمیزی برخوردار است. همچنین ارزیابی توانایی اتصال به سلول های کشت Caco-2 در شرایط *in vitro* نشان داد احتمالا پنج سویه جدا شده از پنیر و ماست سنتی توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند. مقایسه نتایج به دست آمده در شرایط *in vito* و *in vivo* در این تحقیق نشان می دهد روش‌های آزمایشگاهی می توانند راهکاری مناسب جهت انتخاب سویه‌های پروبیوتیک باشند بطوریکه در بررسی های انجام شده در این تحقیق از 46 نمونه لبنی 5 سویه لاکتوباسیل پروبیوتیک انتخاب شد که اثرات مفید آنها در شرایط *in vito* و *in vivo* به اثبات رسید.

Reference:

- Tajabady Ebrahimi. M., Hejazi. M.A., and N. A., Study on probiotic activity of Lactobacillus isolated from traditional dairy products Olome Tarbiat moalem, 2007.

- Upreti G. C. 1973, Isolation and Characterization of a Bacteriocin from a Homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 4, 487-494.

– **Toure.R.,Kheadr.E., 2003,Production of antibacterial substances by *bifidobacterial* isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology, 95: p. 1058-1069**.

- Parvathy Seema Nair.,P.K. Surendran, 2004-2005,Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of culture collections. 4,48-52.

- Fagnant E.J,Sanders C.C.,1982,Development and evaluation of a biochemical scheme for identification of endocervical *Lactobacilli.* Journal of clinical microbiology,926-934.

- Sneath.P.H.A., Mair.N.S., and H. J.G.,1986,Bergys manual of systematic bacteriology Williama & Wilkins, Baltimore,2.

- Matthias A., 2003, Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus* mindensis sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,53.7-13.

- Kalchayanand N., Hanilin M. B., Ray.B., 1992, Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. Lett. Applied Microbiology,15, 239-243

- Blackburn P., Polak J., 1989,Nisin composition for use as enhanced broad range bactericides. International Patent Application publication, p. WO 89112399.

- Harris. L.J., Daeschal.M.A., 1989, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection. 52: p. 384-387.

- Sahl. H.-G., 1983,Efflux of low Mr substances from the cytoplasm of sensitive cells caused by the staphylococcin-like agent, FEMS Microbiology Letter,16, 75-79.

- Van Belkum M. J., Hayema.B. J., and J.R.E. J., 1991,Organization and nucleotide sequence of two *lactococcal* bacteriocin operons. Applied Environmental Microbiology,. 57,492-498

- Zajdel, J.K. and Ceglowski.P,1985, Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by *Streptococcus cremoris.* Applied Environmental Microbiology,49,969-974.

- Allison, G., 1994,Expansion of the bacteriocin activity and host range upon complementation of two peptides encoded within the lactacin F operon. Journal of Bacteriology.,176, 2235-2241.

- Schillinger. U. and L. F-K., 1989,Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol,. 55, 901-1906.

- Annuk, H.,Shchepetova, J., Kullisaar, T., Songisepp, E.,2003. Characterization of intestinal *lactobacilli* as putative probiotic candidates. Journal of Applied Microbiology., 94:403-412.

- Pennacchia, C., et al., *Selection of Lactobacillus strains from fermented sausagefor their potential use as probiotics.* Meat Science, 2004. 67: p. 309–317.

-Chauviere, G., et al., (1992), *Adhesion of human Lactobacillus acidophilus strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells.* Microbiology, 1992. 138(8): p. 1689.

عناوین تحقیقات انجام شده در آزمایشگاه تحقیقات پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران

محمدرضا فاضلی، دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه تهران

1- **باکتریهای خمیر ترش نان و نان‌های سنتی ایران**

2- **تولید ماست‌های پروبیوتیک حاوی سویه‌های مختلف لاکتوباسیل و بررسی اثرات ضد میکروبی و پایداری آن‌ها و همچنین قابلیت کاهش کلسترول توسط آنها**

3- **پروبیوتیکه کردن آب‌میوه‌ها با استفاده از گونه‌های مختلف لاکتوباسیل و بررسی پایداری آنها**

4- **تهیه مکمل‌های غذایی طیور بوسیله مخمر و باکتریهای پروبیوتیک**

5- **بررسی اثرات سویه‌های مختلف لاکتوباسیل در مواجهه با باکتریهای پاتوژن در حضور رده‌های سلولی (سلولهای کلون) (Caco II A549 , L929سلولهای ریه)**

6- **بررسی اترات لاکتوباسیل‌ها بر بالین بیماران یا بر سویه‌های پاتوژن جدا شده از بیمارستانها جهت برآورد میزان اثرگذاری بر گونه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مصرفی.**

7- **سم زدایی بیولوژیک از محصولات غذایی که شامل مبارزه با آفات گیاهی آفلاتوکسین‌ها و مایکوتوکسین پاتولین و توکسین Aکلستریدیوم دیفیل توسط پروبیوتیک‌ها می‌باشد.**

8- **تهیه مواد غذایی تخمیری با استفاده از گونه‌های پروبیوتیکی جدا شده از موادغذایی بومی ایران (مانند زیتون پرورده)**

9- **روش‌های شناسایی مولکولی PFGE, PCRدر شناسایی جنس و گونه باکتریهای پروبیوتیک**

10- **تهیه فرمولاسیون‌های دارویی مختلف از پروبیوتیک‌ها و بهینه کردن شرایط ماندگاری باکتریها بعد از مصرف در داخل بدن.**

11- **تحقیق درباره روش های جدید خشک کردن باکتریهای پروبیوتیک و تولید پودر باکتری و مخمرهای پروبیوتیک و پری بیوتیکهای مورد مصرف انسان و دام.**

مطالعه مقدماتی تولید ماست پروبیوتیک حاوی *Lactobacillus paracasei*

مقدمه و هدف:

Lactobacillus paracasei یکی از سویه‌های جدید پروبیوتیک است که مقاومت بالایی در محیط دستگاه گوارش از خود نشان می‌دهد و خواص حسی- ظاهری مطلوبی را داراست. هدف ما تولید ماست پروبیوتیک با استفاده از *L.paracasei* و آنالیز تغییرات pH، شمارش میکروبی و بررسی خواص حسی-ظاهری ماست تولید شده بود.

روش کار:

برای تولید ماست شاهد، شیری که با افزودن آب مقطر به پودر شیر بی‌چربی (14٪ وزن خشک) تهیه، پاستوریزه و دمای آن به 42°C رسانده شده بود، بوسیله پودر لیوفیلیزهٔ استارترهای ماست که حاوی *Lactobacillus* delbrueckii subsp. *bulgaricus* و *Streptococcus thermophilus* بود، تلقیح گردید. برای تولید ماست پروبیوتیک، شیر توسط *L. paracasei* و همچنین استارترها تلقیح گردید. هر دو نمونه شیر تلقیح شده در دمای 42°C گرمخانه گذارش گردیدند تا pH 4/7 بدست آید. pH و تعداد میکروارگانیسم‌های زنده در طی روند تولید و نگهداری اندازه‌گیری گردید. 30 دانشجوی سالم از هر دو جنس و آموزش دیده، نمونه‌های ماست را بطور تصادفی از لحاظ خواص حسی-ظاهری توسط روش امتیاز دهی 9-1 Karl Ruher ارزیابی کردند. آنالیزهای آماری برای معنی‌دار بودن نتایج مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج: کاهش pH در طی دورهٔ گرمخانه گذاری در شیر تلقیح شده بوسیلهٔ باکتری پروبیوتیک و استارتر سریعتر از شیر تلقیح شده بوسیلهٔ استارتر تنها بود. کاهش رشد استارترها (Generation No) در ماست پروبیوتیک در مقایسه با ماست شاهد طی دورهٔ گرمخانه گذاری معنی‌دار نبود ($P>0.05$) . pH ماست شاهد و پروبیوتیک پس از گذشت 21 روز نگهداری (4°C) کاهش معنی‌داری داشت و به ترتیب به 4/33 و 4/25 رسید تعداد پروبیوتیک‌های زنده در طول دورهٔ نگهداری بصورت خطی کاهش می‌یافتند ولی تعداد آنها تا روز آخر (21) بالاتر از حد استاندارد برای فرآوردهٔ پروبیوتیک (10^6 cfu ml^{-1}) بود. از لحاظ خواص حسی-ظاهری تفاوت معنی‌داری ($P>0.05$) بین دو نمونهٔ ماست شاهد و پروبیوتیک مشاهده نشد. تولید صنعتی ماست بخصوص از این گونه و بومی کردن دانش آن در کشورمان می‌تواند از لحاظ اقتصادی ارزشمند و کاربردی باشد و دسترسی آسان به یک فرآوردهٔ پروبیوتیک و غذایی را برای مصرف کنندگان ایرانی فراهم سازد.

عنوان: تولید ماست پروبیوتیکی با استفاده از استارترلاکتوباسیلوس GG و استریتوکوکوس ترموفیلوس

در این تحقیق با استفاده از دو باکتری لاکتوباسیلوس GG و استرپتوکوکوس ترموفیلوس، بیوماستهایی با نسبتهای مختلف از این دو باکتری تهیه شدند و نمونه‌ها در زمانهای مشخص شامل 0، 2، 4، 6، 8، 10، 12، 14 روز بعد از نگهداری در یخچال از لحاظ ویژگیهای ظاهری مانند قوام ماست و همچنین پایداری باکتریهای بکار رفته و میزان pH نمونه‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مقایسه بین ماستهای تهیه شده، بیوماستی که با نسبت 1:1 از دو باکتری مورد نظر تهیه شده بود، در طول مدت نگهداری قوام بالاتر و کیفیت مطلوبی را نسبت به بقیه نشان داد. و همچنین میزان رشد باکتریهای استارتر موردنظر بعد از مرحله گرمخانه گذاری به 10^8cfu/ml رسید و این تعداد از باکتریها در طی زمان نگهداری نمونه‌ها حفظ شد و ثابت باقی ماند و میزان pH نمونه‌ها نیز در طول این مدت بین 4/6-4/2 بود. در ادامه، به منظور بررسی خاصیت کاهش کلسترول توسط ماست پروبیوتیکی، میزان کلسترول و تری گلیسرید در نمونه بیوماست و همچنین نمونه شیر مصرفی (در تهیه ماست) و نمونه ماست سنتی توسط کیت‌های اختصاصی و سپس تعیین OD توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 546^{nm} تعیین گردید و مشخص شد که میزان این ترکیبات در بیوماست تهیه شده نسبت به دو نمونه دیگر کاهش قابل توجهی را نشان می‌دهد. در بخش دیگر خاصیت ضد میکروبی باکتری لاکتوباسیلوس GG و همچنین بیوماست تهیه شده بر علیه باکتری‌های پاتوژن شیگلا دیسانتری، کلبسیلا پنومونیه، سالمونلاتیفی و استافیلوکوکوس اورئوس با روش Spot test مورد مطالعه قرار گرفت و از طرفی، خاصیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و نمونه ماست سنتی نیز بر علیه باکتریهای پاتوژن نامبرده بررسی شد.نتایج حاصل از این دو آزمایش نشان داد اندازه قطر هاله‌های عدم رشد در پلیتهای مربوط به نمونه لاکتوباسیلوس GG بیشتر از لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و همچنین در نمونه بیوماست نسبت به نمونه‌های مربوط به لاکتوباسیلوس GG بیشتر بود. در قسمت بعد، دوام و پایداری باکتری پاتوژن *Escherichia coli* 0157:H7 (در مقادیر 10^2، 10^4و 10^6 cfu/ml) در نمونه بیوماست تهیه شده بررسی شد و با ماست سنتی مقایسه گردید.

و در طی روند تولید ماست در ساعات معینی (0، 3، 12، 24، 48 و 72) پس از مرحله گرمخانه گذاری میزان کاهش باکتری پاتوژن بررسی گردید، و نشان داده شد که زمانهای حذف باکتری پاتوژن در بیوماست کوتاهتر از ماست سنتی می باشد.

عنوان: اثراستارتر پروبیوتیکی و ضد میکروبی لاکتوباسیل‌های موجود در خمیر ترش

یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های تغذیه‌ای که توسط فرآیند تخمیر تهیه شده است انواع نان‌ها بودند. اصلی‌ترین شیوه برای تهیه نان‌ها استفاده از خمیر ترش‌ها به عنوان یک استارتر طبیعی و سپس افزودن آنها به مواد اولیه دیگر (نظیر آرد گندم یا آرد چاودار، آب و انواع روغن‌ها گیاهی بود). اما با گذشت زمان و افزایش جمعیت و نیز توسعه صنایع مختلف برخی مواد سنتتیک و مضر نظیر سدیم هیدروژن کربنات (جوش شیرین) به طرز وسیعی جهت تهیه انواع مختلف نان‌ها به خدمت گرفته شده‌اند. با اضافه کردن این ترکیبات به مواد اولیه دیگر، فرآیند ورآمدن به گونه‌ای بسیار سریع رخ خواهد داد، ولیکن با افزودن خمیر ترش‌ها به عنوان یک استارتر بیولوژیک و طبیعی به مواد اولیه دیگر فرآیند مذکور حداقل 2 ساعت به طول خواهد انجامید که این موضوع از حیث اقتصادی مطلوب نانوایان نیست، این مسئله بسیار حائز اهمیت است که نان‌هایی که توسط افزودن اینگونه مواد سنتتیک تهیه می‌شوند غالباً کیفیت پایین داشته و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آنها نظیر طعم، بافت، ارزش تغذیه‌ای، زمان فساد و بیات شدن، عمر قفسه‌ای و نامناسبی دارند. جهت انجام این تحقیق

چندین نوع مختلف از خمیرترش‌های سنتی ایران توسط انجام آزمایشات میکرو سکوپیک و بیوشیمیایی مورد بررسی واقع شد، همهٔ باکتری‌های مولد لاکتیک اسید ایزوله شده متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و اکثر آنها متعلق به گونه پلانتاروم بودند. باکتری‌های مولد لاکتیک اسید که از خمیرترش‌های سنتی جدا شدند با توجه به اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد پاتوژن‌ها برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، انتخاب گشتند. بهترین نتیجه متعلق به لاکتوباسیلوس کازئی (T7) بود. 20 میلی‌لیتر از مایع رویی باکتری مذکور به محیط اختصاصی هریک از ارگانیسم‌های پاتوژن اضافه شد. دانسیته نوری قبل و بعد از افزودن مایع در طول موج 600 نانومتر به وسیله دستگاه اسکپتروفومتر UV و با فاصله زمانی 2 ساعته اندازه‌گیری شد. مطابق نتایج حاصله ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی انوان نان نظیر عمر قفسه‌ای میکروبیولوژیک به طرز چشمگیری با افزودن خمیر ترش‌های سنتی به عنوان استارتر بهبود می‌یابد و زیان‌های اقتصادی حاصل از هدر رفت نان نیز قطعاً کاهش خواهد یافت.

عنوان: مقایسهٔ اثر ضد قارچی اسیدهای ارگانیک فنیل استیک، لاکتیک و استیک بر خمیر نان آلوده به سویه‌های کپک جدا شده از نانهای سنتی

در این تحقیق اثرات ضد قارچی فنیل استیک اسید بر روی رایج‌ترین قارچهای فاسدکنندهٔ جدا شده از نان‌ها که متعلق به جنس‌های پنی-سیلیوم، آسپرژیلوس، موکور و رایزوپوس بودند، مورد مطالعه قرار گرفت.

MIC و MFC فنیل استیک اسید به روش رقیق‌سازی در لوله تعیین شدند و با MIC و MFCهای حاصل از دو مادهٔ ضد قارچی استیک اسید و اسید لاکتیک مقایسه شدند.محلول اتانولی فنیل استیک اسید اثر ضد قارچی کمتری را نسبت به اسید استیک با MIC 0/976 mg/ml تا 15/625mg/ml و MFC 3/906mg/ml تا 31/25mg/ml بر روی سویه‌های کپک جدا شده، نشان داد.

عنوان: جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌های موجود در خمیر ترش نان‌های سنتی ایران

باکتری‌های لاکتیک اسید به بهترسازی ویژگیهای حسی نان از قبیل حجم، یکدستی پخت، ویژگی رویه‌ی نان و برش نان، غلات نان، رنگ خرده نان، طعم و خوش بویی، مزه و بافت نان و میزان عمر مفید آن از راه بازداری رشد میکروبها می‌پردازند. تخمیر خمیر مایه براساس لاکتیک اسید و تخمیر الکلی، بستگی به ترکیب ارگانیزم‌های ریزگیاهی و شرایط تخمیر دارد.

یک روند کلی تخمیر خمیرمایه، همزیستی منحصر به فرد باکتری‌های معین جوروناجور تخمیرکننده اسید لاکتیک با شماری از مخمرهای معین می‌باشد و اکثر ویژگی‌ها و خصایص سودمند منتسب به خمیرمایه از راه فعالیت اسیدی سازی باکتری‌های لاکتیک اسید تعیین می-شود که این تخمیر با رشد هوازی و بلافاصله بعد از مخلوط آرد و آب آغاز می‌شود و زمانیکه اکسیژن به پایان رسید تخمیر بی‌هوازی با رشد باکتری لاکتوباسیل آغاز می‌گردد.

لاکتیک اسید باکتریا به تولید اسیدهایی می‌پردازد که موجب پیشبرد رشد سریع آنها زمانیکه ارزش pH جهت دیگر ارگانیزم‌های ریز بدلیل رشد خیلی پایین آمده، می‌گردند. لذا لاکتیک اسید باکتریا به شکل ارگانیزمهای ریز فراوان در خمیر مایه درمیاید و بدین شکل عامل اصلی مراحل نهایی پردازش خمیر مایه می‌گردد.

مراحل کار شامل درست کردن و استریل کردن محیط کشت MRS آگار می‌باشد که از محیط خمیر ترش در محیط MRS آگار کشت 4 منطقه‌ای داده و در انکوباتور 35°C به مدت 48-28 ساعت گذاشته تا باکتریها رشد کنند به منظور تعیین جنس باکتری لاکتوباسیلوس بوسیله‌ی1- رنگ‌آمیزی گرم: که باید با سیل گرم مثبت میله‌ای شکل بدون اسپور باشد به رنگ آبی یا بنفش. 2- تست کاتالاز که فاقد کاتالاز هستند. 3- تست TSI: که باید بصورت اسید، H2S منفی باشد که در این صورت باکتری لاکتوباسیلوس جداسازی می‌شود. و برای شناسایی گونه تست قندی گذاشته که شامل محیط MRS Broth بدون آگارر، گلوکز و meat extract می‌باشد. بعد از شناسایی گونه‌های لاکتوباسیل در خمیر ترش نانهاس سنتی ایران مشخص شد که بیشتر گونه‌ها مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم می‌باشد و تعدادی هم مربوط به گونه‌های دیگر بودند و عده‌ای هم ناشناخته باقی ماندند.

جدول 4-3. تأثیر زمان تخمیر بر بازدهی خمیر

	خمیر با آب	خمیر با شیر کم چرب	خمیر با شیر کامل
بازدهی خمیر٪	158	161	164
مدت تخمیر به دقیقه	65	70	70
حجم نان حاصل از 400 cm3 خمیر	935	810	990

جدول 4-4. بیشترین باکتریهای اسید لاکتیک موجود در خمیر ترش

لاکتوباکتری‌های هتروفرمنتاتیو		**لاکتوباکتریهای هموفرمنتاتیو**	
حرارت اپتیم برای ساخت اسید °C	**نام باکتری**	**حرارت اپتیم برای ساخت اسید °C**	**نام باکتری**
30-35	*L. brevis*	35	*L.delbruclii*
35-40	*L. fermentum*	35-40	*L. Jeichmaii*
30-35	*L. pastorianum*	30-35	*L. plantarum*
35	*L. buchner*	35-40	*L. casei*

عنوان: بهینه‌سازی شرایط رشد لاکتوباسیلوس فرمانتوم جهت استفاده به عنوان افزودنی خمیر ترش

امروزه پروبیوتیکها به عنوان مکملهای طبیعی زنده در صنایع غذایی و دارویی اهمیت روزافزونی پیدا کرده‌اند. امروزه در اکثر نقاط دنیا در تهیه خمیر ترش، تنها به افزودن خمیر مایه و یا همان مخمر معروف ساکارومایسیس سرویزیه بسنده نمی‌کنند و میکروارگانیسمهای متعددی به خمیر اضافه می‌شوند که باعث بهبود کیفیت نان می‌گردند. بدین منظور برخی از کارخانجات خمیر مایع در دنیا به تولید انبوه سویه‌های انتخابی از لاکتوباسیلها روی آورده‌اند و بعضاً محصول خود را به صورت مخلوطی از مخمر و لاکتوباسیلها به عنوان خمیر مایه ترش ارائه می‌کنند. لاکتوباسیلوس فرمانتوم یکی از مهمترین لاکتوباسیلهای جداشده از خمیر ترش است که اثرات آن در افزایش زمان ماند و تأخیر در کپک زدگی نان به اثبات رسیده است. در مطالعه جاری سعی برآن است که با استفاده از کلیه منابع موجود روند تولید غلظت سلولی بالای این پروبیوتیک با در نظر گرفتن حداقل امکانات، در مقیاس آزمایشگاهی بهینه‌سازی گردد تا مقدمات لازم برای تولید آن در مقیاس صنعتی امکان‌پذیر گردد.

مواد و روشها: سویهٔ لاکتوباسیلوس فرمانتوم مورد استفاده در این مطالعه یک سویه بومی جدا شده از نان بربری می‌باشد. ابتدا ایزوله‌های این باکتری از ذخیره 80°C- بر روی محیط MRS broth فعال سازی شدند. با توجه به مقالات و Patentهای موجود، اجزای ثابت و متغییر محیط کشت متشکل از آب پنیر، ملاس چغندرقند، شربت خیساندهٔ ذرت و ریزمغذیها مشخص شدند. در مرحلهٔ اول، تأثیر نسبت-های مختلف پودرآب پنیر (5-15٪) بر میزان رشد باکتری به روش Pour plate بررسی شد. بدین منظور از ارلن‌های حاوی 100 میلی-لیتر محیط هر 2 ساعت تا 30 ساعت، نمونه‌برداری می‌شد. سپس روند رشد باکتری در اجزای محیط به روش one factor at a time بررسی شد. در نهایت، اثر افزودن ریز مغذی MgSO4 و بر میزان و سرعت رشد باکتری آزمایش شد. رشد باکتری در محیط MRS broth نیز به عنوان مرجع به روش وزنی، OD و pour plate اندازه‌گیری شد.

نتایج: ترکیبی از محیط که بیشترین تأثیر را بر حداکثر رشد باکتری داشت. شامل: پودر آب پنیر (100g/l)، ملاس چغندر قند (100g/l)، شربت خیسانده ذرت (30g/l) بود. افزودن ریز مغذی سولفات منیزیم با غلظتهای 0/3g/l و 0/1g/l باعث کوتاه شدن زمان تأخیر و افزایش سرعت رشد باکتری (μmax) گردید. در این محیط، حداکثر رشد باکتری بعد از 18 ساعت به $1/94\times10^{9}$CFU/ml و حداکثر سرعت رشد باکتری به $0/84\ h^{-1}$ رسید.

بحث: نتایج حاصله با توجه به استفاده از مواد ارزان قیمتی نظیر آب پنیر، ملاس چغندرقند و شربت خیسانده ذرت و در مقایسه با نتایج حاصل از محیط کشت اختصاصی این باکتری MRS broth قابل توجه می‌باشد. ترکیبهای بهینه معرفی شده می‌توانند برای کارهای تکمیلی آینده و افزایش مقیاس مورد استفاده قرار گیرند.

لغات کلیدی: لاکتوباسیلوس فرمانتوم، آب پنیر، خمیر ترش

عنوان: غنی سازی پروبیوتیکی آب هندوانه با استفاده از چهار گونه لاکتوباسیلوس

هدف: بررسی این آب میوه به عنوان محیط پایه برای رشد باکتریهای پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی، اسیدوفیلوس، فرمنتوم و پلانتاروم) و تولید آب هنداونه پروبیوتیکه و بررسی اثر ضد میکروبی آن در برابر باکتریهای گرم منفی سالمونلاتایفی و گرم مثبت استرپتوکوکوس آگالاکتیا به روش Spot test.

روش: تلقیح سوسپانسیون میکروبی حاوی $CFU10^2$ به آب هنداونه پاستوریز و نگهداری در انکوباتور37° به مدت 24 ساعت و انتقال به محیطهای4° به مدت 42 روز و پور پلیت در فواصل سه روزه

نتایج : تعداد باکتریها به 10^6–10^7 CFU/ml رسید و در مدت نگهداری در یخچال این تعداد حفظ شد. هاله عدم رشد در برابر باکتریهای پاتوژن پس از 6–2 ساعت قابل توجه بود. اثر ضد میکروبی طبق تحقیقات ما نتیجه تولید اسیدهای ارگانیک تولید شده از قندها و کاهش pH، تولید H_2O_2، متابولیتهای ویژۀ سویه باکتریوسین‌ها و یا مولکولهای غیر اسید لاکتیک می‌باشد.

عنوان: غنی سازی پروبیوتیک گیاه چغندر (Beta vulgaris L.) سه گونه لاکتوباسیل.

هدف و نتیجه: ارزش اقتصادی این گیاه در ریشۀ آن دیده می‌شود که ذخایر قندی فرآوان دارد و در کارخانجات تولید قند از آن استفاده می‌شود. عصاره‌گیری از گیاه به روش‌های ماسراسیون (خیس کردن) و پدکولاسیون انجام گرفته است و نمو داروهای رشد باکتریهای لاکتوباسیل در دمای 4 و محیط و انکوباتور37°C در مدت سه ماه و همین طور کنتیک رشد 24 ساعتۀ باکتریها مورد بررسی قرار گرفته است.

عنوان: غنی سازی پروبیوتیک آب هویج زرد ایرانی توسط چهار گونه لاکتوباسیلوس

در بررسی انجام شده مشاهده گردید که هر چهار گونه لاکتوباسیلوس توانایی رشد و ماندگاری در آب هویج زرد ایرانی را دارد. این بررسی در 3 دمای مختلف صورت گرفت (4–25–37 درجه سانتیگراد)که دمای 4 درجه بهترین نتیجه را در پایداری باکتریها نشان داد. همچنین میزان مصرف قند گلوکز توسط لاکتوباسیلها در آب هویج اندازه‌گیری شد که بیشترین میزان مصرف مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود.در اقدام بعدی میزان تولید اسید لاکتیک تولیدی هرهفته توسط دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشترین میزان تولید اسید را داشت.

اثرات ضد میکروبی در برابر پاتوژنها: اشرشیاکلی–سالمونلاتیفی–شیگلادیسانتری–استافیلوکوکوس اورئوس– باسیلوس سرئوس– باسیلوس سابتلیس–انتروکوکوس فکالیس–کلبسیلاپنومونیه–لیستریامنوسیتوژنز اندازه‌گیری شد. باکتریهای اسپوردار در مدت زمان بیشتری از بین رفتند ولی همه پاتوژنها هاله عدم رشد نشان دادند.

در اقدام بعدی اثر آنتی اکسیدانی آب هویج پروبیوتیک با روش DPPH اندازه‌گیری شد که در بین چهار گونه تنها لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند قدرت آنتی اکسیدانی آب هویج را حفظ کند.

اثر آنتی دیابتی آب هویج پروبیوتیکه شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در موشهای Rat نر بررسی شد که در طول 14 روز تیمار با آب هویج زرد پروبیوتیکه با توجه به بررسی آماری با $P<0.01$ بصورت معنی‌داری به درمان دیابت جواب داده‌اند.

عنوان: بررسی غنی سازی پروبیوتیکی نوشیدنی میوه‌ای برپایه لبنی با استفاده از چهارگونه لاکتوباسیل

روش انجام طرح مانند تحقیقات قبلی می‌باشد.

نتایج: این فرآورده‌ها در دمای یخچال کانت 10^8cfu/ml را در مدت 90 روز را کاملاً حفظ می‌کنند و در بین چهار گونه، لاکتوباسیلوس کازئی بیشترین ماندگاری را دارا است. pH فرآورده تغییرات محسوسی نداشت که این امر در عدم تغییرات در کیفیت نوشیدنی دلالت می-کند.

عنوان: بررسی کینتیک رشد لاکتوباسیلوس GG در عصارهٔ آبی برگ درخت زیتون. (Olea europaea L.)

هدف: بهبود اثرات فارماکولوژیک بررسی شده در برگ زیتون شامل اثر بر سیستم قلبی عروقی و فشار خون دیاستولیک و سیستولیک و اثر بر بیماری دیابت می‌باشد.

نتیجه: در مدت دو ماه در شرایط دمایی مختلف رشد مناسبی از باکتری مشاهده شد و اثبات اثرات ضد کلسترول از طریق کیتهای اختصاصی سنجش کلسترول و تری گلسیرید انجام گرفته و تایید شد. اثر ضد میکروبی قوی علیه استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس گروه B و اشریشیاکلی از خود نشان داد.

عنوان: تأثیر مکمل پروبیوتیک تهیه شده با پایهٔ هسته انار، ملاس و CSL بر باکتریهای پاتوژن روده‌ای. (*E. coli, S. typhi*)

عصاره انار حاوی مقادیر بالایی (40٪) الاژیک اسید می‌باشد همچنین پونیسیک اسید و الاژیک اسید موجود در انار دارای خاصیت ضد باکتری و ضد سرطان می‌باشد. هسته‌های انار نسبت به گیاهان علفی سلولز بیشتری دارند و غنی از پلی ساکارید هستند.

محیط 1 شامل 20 گرم پودر هسته انار و 30ml آب بود. محیط 2 شامل 15ml آب + 15ml ملاس چغندرقند و محیط 3 شامل 7/5ml آب، 7/5ml CSL و 15ml ملاس چغندرقند بود. در هر سه محیط لاکتوباسیل کازئی قادر به رشد بود اما در محیط 3 پایداری بهتری در مدت سه ماه مشاهده شد و کانت باکتریها از 10^5 کمتر نشد. اثر ضد میکروبی این مخلوط در برابر باکتریهای پاتوژن ذکر شده قابل توجه بود. بنابراین می تواند با توجه به خواص گفته شده در تغذیه حیوانات مورد استفاده قرار گیرد.

عنوان: بررسی اثر چسبندگی سویه‌های مختلف لاکتوباسیل ومیکروارگانیسم‌های پاتوژن روده‌ای به سلولهای ردهٔ CaCo-2

هدف: تهیه سویه‌های بومی از مردم کشورمان و مقایسه آن با سویه‌های محصولات خارجی از لحاظ چسبندگی به سلولهای روده‌ای که یکی از مهمترین اثرات پروبیوتیکی لاکتوباسیلها می‌باشد.

در طول سالهای اخیر امکانات آزمایشگاهی کشت سلولی در آزمایشگاه تحقیقات پروبیوتیک دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران فراهم شده است. پس از کشت سلولهای CaCo-2 و مجاورت همزمان آن با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جدا شده از مدفوع و سالمونلاتیفی و گذشت زمان مناسب پس از رنگ‌آمیزی تعداد باکتریهای سالمونلای چسبیده به سلولهای مورد نظر در حضور غلظتهای مختلف لاکتوباسیل به ما نشان داد که اگر چه تعداد 106 CFU/ml لاکتوباسیلها باعث کاهش معنی‌دار تعداد سالمونلاها می‌شود اما تعداد 10^7 CFU/ml لاکتوباسیل توانایی کاهش تعداد باکتریهای سالمونلا را به زیر تعداد بیماریزای خود دارا است.

عنوان: کاهش آفلاتوکسین B1 بوسیلهٔ سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس در in-vitro.

هدف: سم زدایی بیولوژیک آفلاتوکسین‌ها، پاتولین و توکسین A مسلماً نسبت به انواع شیمیایی آفت کشها دارای برتری است. مهمترین قارچ تولیدکننده آفلاتوکسینها آسپرژیلوس فلاووس است و آفلاتوکسین تولیدی آن که نوع B1 سمی‌ترین نوع آن می‌باشد یک سرطان‌زای قوی در انسانها و حیوانات است.

اثرسه گونه لاکتوباسیل شامل کازئی، پلانتونوم و فرمنتوم بر کاهش میزان AFB1 آزاد در شرایط دمایی انکوباتور و بصورت in-vitro بمدت 72 ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌گیری از فاز مایع سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ محلول آفلاتوکسین B1 در بافر فسفات و باکتری تلقیح شده به آن و همچنین از نمونه‌های شاهد حاوی AFB1 انجام گرفت و با روش Revers phase HPLC آفلاتوکسین آزاد تعیین مقدار شده است.

نتایج نشان داد اتصال قابل توجهی از باکتری با AFB1 در مدت مورد مطالعه انجام می‌گیرد که البته به منظور عدم جداسازی کمپلکس و برگشت آن به محیط لازم است کمپلکس ایجاد شده از محیط خارج شود.

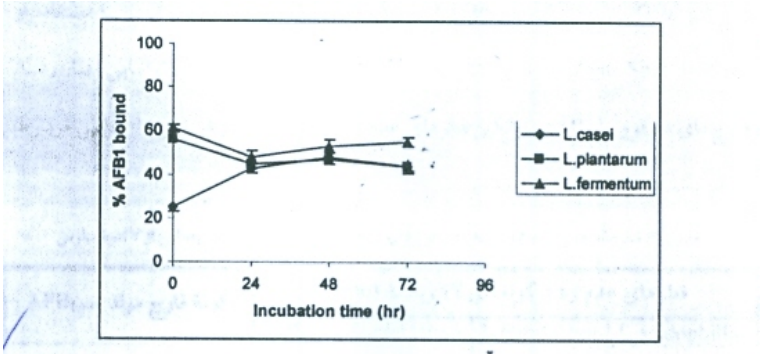


Figure 1. Effect of incubation time on aflatoxin B1 binding by Lactobacillus strains. Each value is a mean ± S.D. of triplicate assays.

نتایج حاصل از بررسی اثر آنتاگونیستی گونه‌های لاکتوباسیل بر رشد قارچ‌های مولد آفلاتوکسین با متد Agar Spot Test:

نتایج نشان داد تمام گونه‌های مورد مطالعه توانایی مهار رشد قارچهای مذکور را داشتند.

قطر هالهٔ عدم رشد ایجاد شده در قارچ‌های مولد آفلاتوکسین بوسیلهٔ سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس

گونهٔ قارچ مولد سم AFB1	قطرهای عدم رشد گونه‌های لاکتوباسیل (mm)			
	L.casei	*L.phantarum*	*L.fermentum*	*L.acidophillus*
قارچ آسپرژیلوس فلاووس	42	20	17	14
قارچ آسپرژیلوس نایژر	27			

عنوان: تأثیر پروبیوتیکها بر میزان غلظت مایکوتوکسین پاتولین در آب سیب آلوده

سطح استاندارد بین‌المللی پاتولین در محصولات سیب 50 ppm می‌باشد که بالا بودن میزان پاتولین از موانع مهم صادرات این محصول می‌باشد.

در این تحقیق قابلیت سه سویه لاکتوباسیل در جهت حذف پاتولین نشان داد لاکتوباسیلهای مورد استفاده می‌توانند تا 86٪ پس از 24 ساعت انکوباسیون و 100٪ پس از 72 ساعت انکوباسیون میزان پاتولین را در آب سیب آلوده کاهش دهند که بسیار بالاتر از 34٪ گزارش شده توسط محققان قبلی بود. قابلیت ذاتی این سویه‌های پروبیوتیکی در کاهش مقادیر سم ممکن است از دو طریق حاصل شود: اتصال ساده به آنها یا از طریق تبدیل آنها به ترکیباتی با سمیت کمتر. کاهش آنی پاتولین بوسیله سه گونه بومی لاکتوباسیل در این مطالعه به ما اجازه میدهد که پیشنهاد کنیم جذب سطحی سم توسط سلول باکتری مسئول سم‌زدایی آب سیب میباشد.

در مرحله بعد میزان آلودگی به 250 ppm افزایش داده شد که در این مرحله نیز افزایش زمان انکوباسیون به 72 ساعت باعث حذف 100٪ پاتولین از آب سیب شد.

استفاده از روش‌های بیولوژیک نسبت به استفاده از اشعه گاما، فرآیند حرارتی، تخمیری و فرآوری اولیه صورت گرفته که نتایج چندان مطلوبی نشان نداده‌اند دارای برتری است.

عنوان: تأثیر ساکارومایسس بولاردی بر توکسین A نمونه‌های کلینیکی کلستریدیوم دیفیسیل

کلستریدیوم دیفیسیل از مهمترین عوامل ایجاد اسهال عفونی در بیماران بستری در بیمارستان است. تست شناسایی توکسین کشت سلول و الیزا می‌باشد. در این مطالعه از 409 نفر نمونه مدفوع گرفته شد برای کشت سلولی از رده‌های سلولی T47Dو Vero و دو روش کشت مستقیم و شوک اتانولی استفاده شد. در این مرحله از محیط کشت سیکلوسرین سفوکسی تین فروکتوز آگار+ 7٪ سرم اسب استفاده گردید.مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های بدست آمده با استفاده از روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت.از روش SPOT TEST و روش Well Test برای بررسی اثر ضد میکروبی ساکارومایسس بولاردی استفاده شد.

برای کشت مخمر از محیط ملاس چغندرقند و عصاره ذرت به جای محیط تجاری SDB استفاده شد. با استفاده از کیت الیزای توکسین A 3/7٪ و با روش کشت سلولی 4/4٪ از نمونه‌های مدفوعی مثبت بودند. نتایج حاکی از آن بودند که مخمر ساکارومایسس بولاردی هیچگونه اثر کشندگی یا ممانعت از رشد روی باکتری کلستریدیوم دیفیسیل ندارد اما سوپرناتانت این مخمر قادر به تجزیه هر دو توکسین A و B تولیدی این باکتری است.

عنوان: تهیه زیتون پرورده تخمیری با استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از زیتون شور ایران

از زیتونهای تهیه شده از بازار لاکتوباسیلوسها را جداسازی کرده و در محیط MRS agar کشت داده شد تا کلنی‌های خالص بدست آید. برای تشخیص جنس از رنگ‌آمیزی گرم و از تست‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، motility ، تولید سولفید هیدروژن، اندول و TSI برای تشخیص گونه استفاده شد.

سپس تلقیح لاکتوباسیلها به ارلن‌های حاوی مقادیر 1، 3، 5، 7، 10 و 15 درصد انجام شد و هر دو ساعت یکبار بمدت 24 ساعت با اندازه‌گیری OD اسپکتروفتومتر منحنی رشد باکتریها ثبت شد.

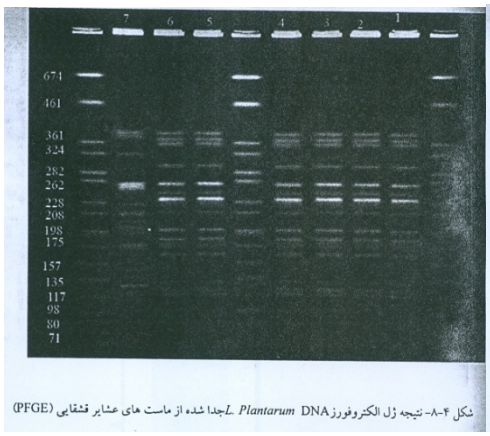
نتایج اندازه‌گیری pH نمونه‌ها نشان داد بعد از یک هفته pH از حدود 7 به 14 کاهش می‌یابد که نشاندهنده انجام عمل تخمیر بود.

عنوان: آنالیز مولکولی سویه‌های مهم لاکتوباسیلهای پروبیوتیک جدا شده از نمونه‌های ماست عشایر بختیاری و قشقایی ایران به روش : آنالیز مولکولی سویه‌های مهم لاکتوباسیلهای پروبیوتیک جدا شده از نمونه‌های ماست

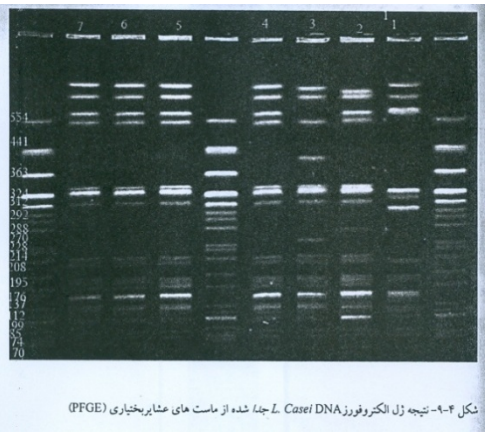
عشایر بختیاری و قشقایی ایران به روش ژل الکتروفورز (PFGE) و Multiplex PCR و بررسی اثرات آنها بر روی باکتریهای پاتوژن روده‌ای.

194 نمونه از ماستهای عشایر بختیاری و قشقایی در دو نوبت زمستان و تابستان جمع‌آوری شدند سپس لاکتوباسیلها با استفاده از تستهای بیوشیمیایی و PCR شناسایی شدند و با متد PFGE رابطه فیلوژنی آنها بررسی گردید در نهایت اثرات مهاری آنها بر روی سالمونلاتیفی و ای‌کلای اندازه‌گیری شد.

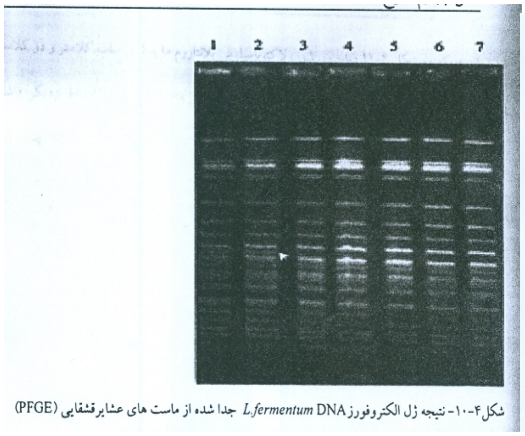
نتیجه: با استفاده از تستهای بیوشیمیایی تنها 76٪ لاکتوباسیلها شناخته شدند ولی با استفاده از روشهای مولکولی بیش از 96٪ لاکتوباسیلها شناسایی شدند. در بررسی با PFGE 74٪ سویه‌های جدا شده از ماستهای قشقایی روی *E. coli* و 69٪ بر روی *S. typhi* موثر بودند که حدود 2 تا 3٪ بالاتر از ماستهای بختیاری بود. جهت شناسایی دقیق اکثر سویه‌ها میبایست PCR براساس ژن 16SrRNA انجام شود. برای شناسایی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک چندین پرایمر تنظیم شد و برای بقیه موارد پرایمر اختصاصی طراحی گردید.



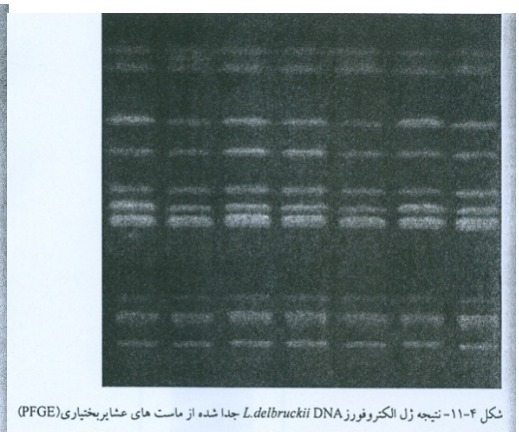
شکل ۴-۸- نتیجه ژل الکتروفورز DNA *L. Plantarum* جدا شده از ماست های عشایر قشقایی (PFGE)



شکل ۴-۹- نتیجه ژل الکتروفورز DNA *L. Casei* جدا شده از ماست های عشایربختیاری (PFGE)



شکل۴-۱۰- نتیجه ژل الکتروفورز DNA *L.fermentum* جدا شده از ماست های عشایرقشقایی (PFGE)


شکل ۴-۱۱- نتیجه ژل الکتروفورز DNA *L.delbruckii* جدا شده از ماست های عشایربختیاری(PFGE)

عنوان: فرمولاسیون باکتری E.Coli Nissle 1917 به روس میکروانکپسولاسیون

روش: میکروکپسول هایی حاوی E. coli Nissle 1917 از پلیمرهای آلژینات، کایتوزان، پکتین به روش Extrusion با کمک دستگاه انکپسولاتور ساخته شد. رشد میکروارگانیسم قبل و بعد از میکروانکپسوله کردن و بقای باکتری انکپسوله در محیط معده (محلول 0/08 مولاراسیدکلریدریک حاوی 0/2 سدیم کلراید با pH معادل 1/55) و محیط روده (محلول 0/05 مولار پتاسیم دی هیدروژن فسفات با pHمعادل 7/43 بررسی گردید. چسبندگی پلیمرها به روش کدورت سنجی و با استفاده از موسین به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر مقایسه شد. شکل ظاهری و اندازه ذره‌ای میکروسفرها نیز بوسیله میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

تعداد کلونی باکتری EcN قبل و بعد از میکروانکپسوله کردن و بقای باکتری انکپسوله در محیط روده و معده

	قبل از انکپسولاسیون	بعد از انکپسولاسیون	در محیط روده	در محیط معده
الژینات	$2/85\times10^8$	$4/15\times10^5$	$3/96\times10^5$	0
کایتوزان	$2/85\times10^8$	0	0	0
پکتین	$2/85\times10^8$	0	0	0

با توجه به نتایج برای میکروانکپسولاسیون پلیمر الژینات توصیه می‌شود زیرا میکروکپسولهای حاصله سایز کوچکتری دارند(600 میکرومتر)، باکتری در آنها زنده می‌ماند (به علت عدم آبگیری زیاد توسط این پلیمر در مقایسه با پکتین و کایتوزان) و تا حدی دارای چسبندگی به سلولهای روده هستند.

عنوان: تهیه اشکال آهسته رهش واژینال و جوشان از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

هدف: بقای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در فرمولهای آهسته رهش پلیمرهای HPMC-LV، HPMC-HV ، پلی کربوفیل، کربومر و SCMC و همچنین در قرصهای جوشان با هسته اسید آدیپیک و اسید سیتریک.

نتیجه: پلیمر کربومر بهترین نتیجه را در حفظ کانت باکتریها در مدت مورد نیاز درمانی از خود نشان داد بنابراین در جلوگیری از انواع واژینیت‌ها استفاده از این فرمول که بیشترین شباهت را با فلور طبیعی واژن داراست بجای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و هورمونهای صناعی برتری دارد همچنین پلیمر آدیپیک اسید در مقایسه با اسید سیتریک در محلول جوشان حاصل کانت بهتری از باکتری نشان میدهد.

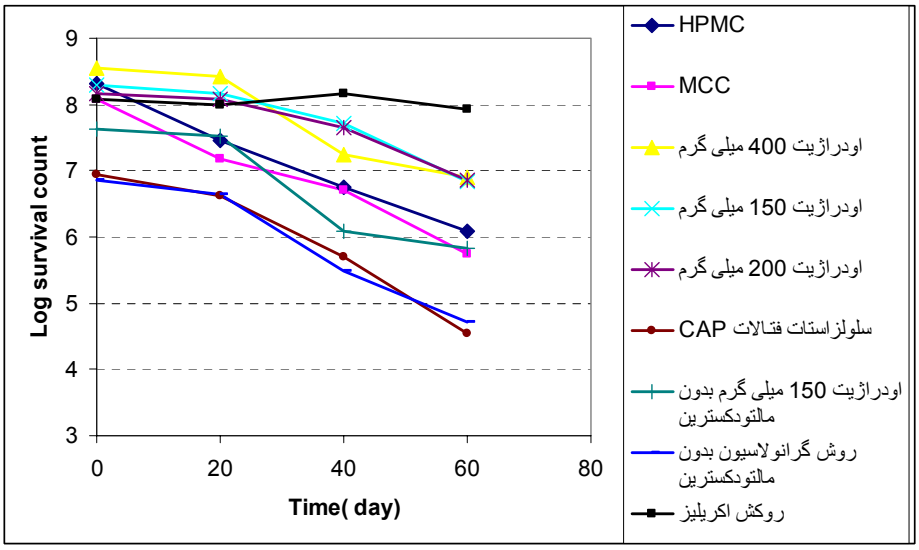
عنوان: تهیه اشکال دارویی جامد خوراکی از لاکتوباسیلوس کازئی GG با استفاده از روش اسپری دراینگ.

هدف: بهینه کردن شرایط خشک کردن و فرمولاسیون باکتری *Lactobacillus casei* GG با استفاده از روش اسپری دراینگ می باشد زیرا روش فریز دراینگ علی رغم تائید کارایی آن ،بسیار پرهزینه وزمانبر است. برای مقاوم سازی باکتری ها از القای شوک حرارتی و اسموتیک به منظور بالا بردن توان مقاومت سلولها از طریق heat shock proteins استفاده گردید. در مرحله بعد با استفاده از پلیمرهای

مختلف انتریک ریلیز و روش پرس مستقیم قرص های 150، 200 و 400 میلی گرمی از پودر حاصله تهیه شده و با شبیه سازی شرایط داخل معده و روده باز شدن فرمول های مختلف بررسی گردید.

نتایج: القای بیش از 100 درجه سانتیگراد دما و حدود 6–4 bar فشار حین اسپری دراینگ می تواند باعث آسیب هایی به دیواره سلولی باکتری گردد ولیکن استفاده از 5٪ پلی ساکارید مالتودکسترین به همراه Permeate10٪ ، 2/5 ٪ yeast extract و 2/5٪ sucrose در شرایط کنترل شده برای دستگاه، در طی 3–2 ماه نگهداری بهترین نتیجه را داشت. نسبت های مختلف اودراژیت L100-55، پلیمرهایی مانند HPMC, Cellulose acetate phthalate و Micro crystalline cellulose بررسی شدند که قرص های تهیه شده از طریق روکش اکریلیز بهترین پایداری و خصوصیات مربوط به قرصها را پس از 80 روز نگهداری در دمای 4^0 C یخچال نشان دادند.

جدول 3–3. مقایسه جامعی از فرمولاسیون های Double compression, CAP ، اودراژیت 150 میلی گرمی بدون مالتودکسترین، گرانوله و روکش اکریلیز.



شکل: : مقایسه پایداری تمامی فرمولاسیون های تهیه شده از پودر اسپری درای شده لاکتوباسیلوس کازیی در مدت مورد مطالعه 60 روز. نتایج آماری، حاصل میانگین سه نمونه بدست آمده باشرایط مشابه ولی مجزا هستند.

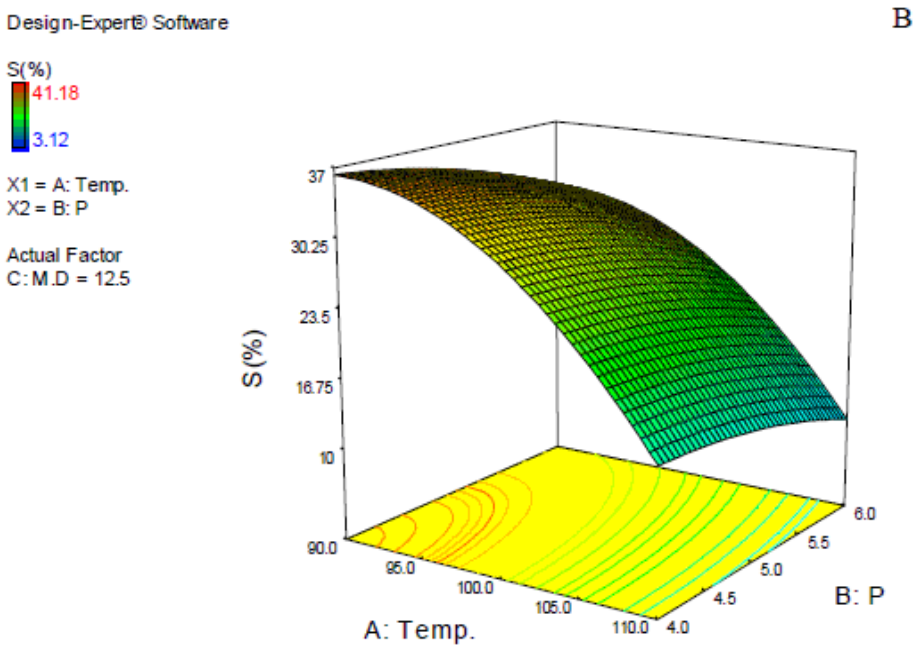
عنوان: ارائه روش بهینه برای خشک کردن *Bifidobacterium bifidum* با استفاده از اسپری درایینگ.

هدف از این تحقیق، تعیین شرایط بهینه ای برای خشک کردن پاششی سوسپانسیون *Bifidobacterium bifidum* است. به این منظور سوسپانسیونهایی حاوی پودر آب پنیر، سوکروز، عصاره ذرت و مالتودکسترین تهیه و پس از استرلیزاسیون، *B. bifidum* PTCC 1644 به آن تلقیح شده و به مدت 48 ساعت در انکوباتور 37 درجه سانتیگراد و در شرایط بی هوازی قرار گرفت؛ سپس توسط خشک‌کن پاششی مدل(Buchi B-191(Buchi, Flawil, Switzerland، و تحت شرایط از پیش تعیین شده برای هر آزمایش خشک شد.

از نقطه نظر آماری، در شرایط بهینه برای رسیدن به حداکثر درصد زنده ماندن و حداقل مقدار رطوبت در پودر محصول، مقادیر فاکتورهای اصلی به صورت زیر گزارش شدند:

دمای هوای ورودی = 103/15°C ؛ فشار هوا = 4/00bar ؛ مقدار مالتودکسترین = 15/00gr.

براساس مدل های پیش بینی شده برای پاسخها، دمای هوای ورودی موثرترین فاکتور بر هر دو پاسخ می‌باشد. همچنین می‌توان گفت رطوبت پودر محصول پس از دما بیشتر به مقدار مالتودکسترین بستگی دارد تا به فشار، اما در مورد درصد زنده ماندن فشار عامل موثرتری نسبت به مالتودکسترین می‌باشد.



اثر دما و فشار بر درصد زنده ماندن B.bifidum؛ (A) contour plot (B) 3D plot

عنوان: بررسی کینتیک رشد لاکتوباسیلوس کازئی GG در محیط آب پنیر(permeate) غنی شده با CSL و ملاس چغندر قند برای تهیه محیط کشت صنعتی.

در این تحقیق از محیط کشت MRS broth به عنوان کنترل استفاده شد و نقش عوامل تشکیل دهنده کربوهیدراتی و نیتروژنی محیط یعنی permeate ، CSL و ملاس چغندر قندکه همگی از منابع بومی و ارزان هستند بررسی گردید.

با استفاده از فرمانتور نیمه صنعتی 1 لیتری در مدت 30 ساعت انکوباسیون در محیط کشت حاوی 10٪ permeate ,

3٪ CSL و 2٪ ملاس چغندر کانت باکتری تلقیح شده به حدود 10^{10} CFU/ml رسید که این میزان بسیار بالاتر از محیط غنی آزمایشگاهی MRSB بود.

عنوان: جداسازی سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها از منابع انسانی و بررسی اثرات ضد میکروبی in-vitro به سویه‌های کلینیکی سودومونا آئروژینوزا

هدف: بدلیل مقاومت سودوموناآئروژینوزا به آنتی‌بیوتیکهای رایج و عوارض این داروها دستیابی به دارویی که دارای طیف اثر وسیعتر عوارض جانبی کمتر و هماهنگ با سیستم بدنی باشد در درمان عفونتهای شایع این میکروب ضروری به نظر می‌رسد.

روش: بر روی 30 نمونه کلینیکی از سودوموناآئروژینوزا جمع‌آوری شده از بیمارستانهای امام خمینی، شریعتی و آزمایشگاه پاتوبیولوژی دانش از نمونه‌های خون، ادرار، ترشحات زخم، جراحی عصب، توراکس و ترشحات چشم آزمایشات اثرات آنتاگونیستی سویه‌های مختلف لاکتوباسیل از جمله *L. reuteri* و *L. casei* و *L. acidophilus* انجام شد.

روشهای چاهک پلیت و Spot agar test و اندازه‌گیری OD و نیز اندازه‌گیری تعداد کلنی‌ها در هر میلی لیتر بکار گرفته شدند که نتایج نشان دهنده اثرات خوب اسیدوفیلوس و اثرات متوسط کازئی و روتری بر روی سویه‌های سودوموناس می‌باشد.

اثرات لاکتوباسیلوس کازئی بعنوان پروبیوتیک بر روند رشد تومور درسرطان پستان موش BALB/c

دکترمحمد مهدی سلطان دلال[1] *، محمد حسین یزدی[1]،دکتر زهیر محمد حسن[2]، مرضیه هولاکویی[3]، ترانه پیمانه عابدی محتسب[1]، سولماز آقا امیری[1]، مهدی مهدوی[2]

۱ -گروه میکروب شناسی، دپارتمان پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت،دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲-بخش ایمنولوژی د،دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس

۳-آزمایشگاه ایمنولوژی مولکولی، دپارتمان ایمنولوژی، انستیتو پاستور ایران

خلاصه:

مقدمه واهداف : لاکتوباسیلوس ها رایجترین میکروارگانیسم های مورد استفاده بعنوان پروبیوتیک می باشند. خواص ضد توموری این دسته از باکتریها در مطالعات گوناگون نشان داده شده ، این خواص احتمالابدلیل وجود ویژگی ایمنومدولاتوری یا تنظیم کننده سیستم ایمنی مربوط به این باکتریها می باشد .در مطالعه حاضر هدف بررسی اثرات لاکتوباسیلوس کازئی بعنوان پروبیوتیک برروند رشد تومورو وضعیت موشهای مبتلا به سرطان پستان می باشد.

مواد و روشها: تعداد 18 سر موش ماده ۶تا ۸هفته ای با وزن تقریبی 30-25 گرم در شرایط یکسان بطور تصادفی در دو گروه تقسیم شدند که هرگروه شامل 9عدد موش بود .یکی از گروه ها بعنوان کنترل در نظر گرفته شد.موشهای گروه اول بمدت ۲هفته قبل از توموری شدن روزانه به میزان نیم میلی لیتر سوسپانسیون لاکتوبایسلوس کازئی (2.7×10^8 CFU/ml)را دریافت کردند و بعد از توموری شدن هم با وقفه های ۳ روزه بصورت دوره های ۷ روزه لاکتوباسیلوس کازئی را در یافت نمودند.گروه دوم بعنوان گروه کنترل در تمام طول مطالعه با حجم یکسان و شرایط مساوی PBS دریافت کردند.

یافته ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در موشهای دریافت کننده پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی میزان پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری 48 ساعته در تحریک مجدد با آنتی ژن اختصاصی تومور بیشتراز گروه کنترل دریافت کننده PBS بود که این موضوع از نشانه های تحریک سلولهای Th1 خاطره ای میباشد. علاوه براین سرعت رشد تومورنیز در موشهای گروه لاکتوباسیلوس کازئی کمتر ازگروه کنترل بود که دلیلی بر افزایش کارآمدی سیستم ایمنی این گروه از موشها در برابر تومور در مقایسه با گروه کنترل می باشد.همچنین نتایج هیستوپاتولوژی نیز نشان دهنده افزایش معنی دار نکروز داخل توموری درلام تهیه شده از تومور موشهای گیرنده پروبیوتیک نسبت به موشهای کنترل می باشد

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه می توان گفت که مصرف روزانه لاکتوباسیلوس کازئی می تواند باعث تقویت پاسخ ایمنی علیه تومور شده و احتمالا این پروبیوتیک می تواند بعنوان یک عامل حمایت کننده در درمان سرطان مطرح شود، اما هنوز نیاز به انجام مطالعات بیشتر وبررسی های دیگری برای کشف مکانیسم های دقیقتر این اثرات وجود دارد

کلید واژه: پروبیوتیک،لاکتوباسیلوس کازئی، رشد تومور،سرطان پستان

مقدمه : سرطان پستان یکی از شایعترین بد خیمی های زنان در جهان می باشد که شیوع متفاوتی در بین ملل مختلف دارد،بالاترین شیوع این بدخیمی مربوط به زنان سفید پوست در آمریکا و کمترین آن مربوط به زنان چینی و ژاپنی می باشد.(1) در سال 2001 انجمن سرطان آمریکا 192200 مورد از این بیماری را گزارش نمود که بیانگر اهمیت این مسا له می باشد در سال 2003 در جامعه آمریکا 39800 نفر زن و 400 نفر مرد به دلیل ابتلا به سرطان پستان جان خود را از دست دادند. بیشترین میزان این بیماری در کشورهای توسعه یافته اروپایی و شمال آمریکا بوده و بیشترین میزان مرگ و میر این دسته از سرطانها بین سنین 40 تا 50 سال می باشد و سالانه 14000 مورد مرگ از این بیماری مشاهده می شود(2و3) . همچنین سرطان پستان به عنوان دومین سرطان شایع در بین زنان ایرانی مطرح می باشد وبر اساس گزارشات موجود میزان شیوع آن در کشور ما 100000/ 120 می باشد که از برخی از کشورهای غربی نیز بیشتر است (4).

سرطان پستان یک بیماری پیچیده و دارای علائم کلینیکی مختلف و سرانجام های متفاوت می باشد و پاسخهای ایمنی به نظر نقش عمده ای در روند توسعه این بیماری دارند(5) بسیاری از مطالعات صورت گرفته روی بیماران مبتلا به سرطان پستان حاکی از کاهش پاسخ های ایمنی از جمله پاسخ افزایش حساسیت تاخیری،عملکرد سایتو لیتیک،کاهش تکثیر در سلولهای ایمنی و در نتیجه کاهش سایتوکائینها در اثر ابتلا به این سرطان می باشد(6) لذا استفاده از عواملی که موجب تقویت سیستم ایمنی می شوند در کنترل این سرطان کمک کننده می باشد. یکی از عوامل مطرح در تقویت سیستم ایمنی پروبیوتیک ها هستند. پروبیوتیک ها در حقیقت همان باکتریهای مفید در دستگاه گوارش بدن هستند که دارای قابلیت های مختلفی می باشند که یکی از مهمترین آنها ایجاد تعادل بین دستگاه گوارش و سیستم ایمنی بدن می باشد (7). در واقع پروبیوتیکها دسته ای از میکروارگانیسمها ی زنده هستند که در صورت مصرف با یک میزان معین اثرات مفیدی را بر سلامت مصرف کننده گان ایجاد می کنند(8) این میکروارگانیسم ها دارای اثرات تحریک کنند ه گی و تقویت کننده گی بر روی سیستم ایمنی هستند بطور مثال در مطالعه ای که روی موشهای مبتلا به نقص ایمنی صورت گرفت نقش پروبیوتیک ها به عنوان یک عامل موثر Immunomodulator در بهبود پاسخ ایمنی نشان داده شده است(9) امروزه لاکتوباسیلوس ها وبیفیدوباکتریوم ها بیشترین میکرو

ارگانیسمها یی هستند که بعنوان پروبیوتیک کاربرد دارند. اثرات مفید گونه های مختلف این باکتریها در مطالعات مختلف نشان داده شده است با این حال این خواص از گونه ای به گونه دیگر متفاوت بوده و در مطالعات گوناگون محققین این خواص را اختصاصی گونه و استرین دانسته اند(10). از آنجا که برخی استرینهای لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس و لاکتو باسیلوس کازئی در مطالعات گذشته به عنوان عوامل موثر در ممانعت از رشد تومورهای پیوندی در مدل های تجربی حیوانی شناخته شده اند (11و12) لذا دراین مطالعه هدف بررسی اثراسترین جدید لاکتوباسیلوس کازئی ATCC39392 درتومورسرطان پستان ایجاد شده در مدل موش BALB/c می باشد.**مواد و**

روشها:

میکروارگانیسم :

از کلکسیون قارچها وباکتری های **ATCC** 39392 سوش استاندارد لاکتوباسیلوس کازئی صنعتی وبیماریزای ایران تهیه شده ودر محیط آگار MRS (Merck) کشت داده شد.

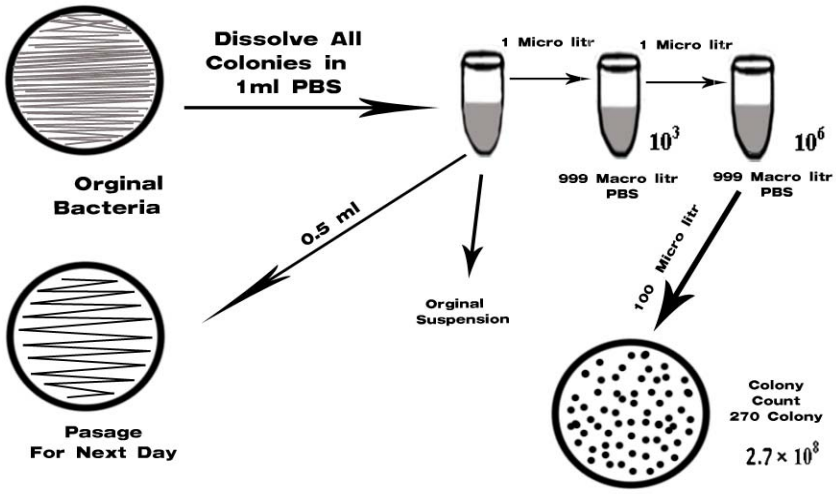
حیوانات آزمایشگاهی:

تعداد 18 عدد موش ماده BALB/c inbread با سن تقریبا 6 تا8 هفته از انستیتو پاستورتهران خریداری شدند ودر شرایط استاندارد نگهداری حیوانات آزمایشگاهی (12/12 روشنایی/تاریکی،غذای پلت استاندارد،دمای 24 درجه و رطوبت 52) نگهداری شدند، ضمن اینکه در هر گروه بمنظور جلوگیری از از دست رفتن احتما لی موشها در حین مطالعه 2 موش اضافه در نظر گرفته شد. ضمنا موشها پس از انتقال به حیوان خانه بمدت یک هفته بمنظور تطبیق با شرایط محیط جدید نگهداری شدند وپس از آن مطالعه روی آنها شروع شد.

گروهها و روش تجویز پروبیوتیک:

CFUمناسب تجویز و روش تجویز پروبیوتیک به این صورت بود که ابتدا باکتری در محیط MRSکشت داده شده و پس از 18 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی گراد کلنی های رشد کرده روی CFU جمع آوری شده و با روش رقت سازی (رایج در آزمایشگاهها) میزان 10^{8}×2.7 PBS محیط بااز باکتری تهیه و روزانه نیم میلی لیتر از این محلول با استفاده از سوزن مخصوص گاواژ به هر موش خورانده شد. بجز گروه کنترل که به میزان مساوی PBS دریافت کردند. در واقع در این مطالعه 2گروه 9 تایی موش وجود داشت که 14 روز قبل از پیوند توموربه ترتیب گروه اول لاکتوباسیلوس کازئی و گروه دوم بعنوان گروه کنترل بصورت هم حجم PBS دریافت نمودند

بعد از پیوند نیزموشها با وقفه های 3 روزه و بصورت دوره های 7روزمتوالی پروبیوتیک یا PBS دریافت نمودند واین روند تاپایان روز 44 مطالعه ادامه یافت.(**شکل1**)



شکل1 تهیه CFU مناسب تجویز و نحوه شمارش کلنی : در این شکل روش رایج در رقت سازی و کلنی کانت نشان داده شده به این ترتیب که ابتدا کل کلنی های رشد کرده در محیط MRS آگار راتوسط 1 سی سی PBS جمع کرده و به لوله استریل منتقل میکنیم،سپس 1 میکرولیتر از این سوسپانسیون را به لوله بعدی که حاوی 999 میکرولیتر PBS می باشد منتقل می کنیم و به این ترتیب سوسپانسیون اورجینال را 10^3 بار رقیق کرده ایم این عمل را یکبار دیگر تکرار میکنیم و این بار رقت 10^3 را 1000 بار رقیقتر میکنیم سپس 100 میکرولیتر از رقت 10^6 حاصل را روی محیط MRS آگار کشت داده و 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه میکنیم و بعد تعداد کلنی های رشد کرده را شمارش میکنیم که در اینجا کلنی های رشد کرده از 100 میکرولیتر سوسپانسیون 10^6 برابر 270 عدد بود که با محاسبات ریاضی می توان آنرا معادل 2.7×10^8 دانست

توموری نمودن موشها:

موش توموری مدل سرطان خودبه خودی (Spontaneous) پستان توسط دکتر حسن و همکارانش تائید شد و تومور بعد از نخاعی نمودن موش بصورت استریل از بدن آن خارج شده و در نرمال سالین استریل با اسکالپل وتیغ جراحی به قطعات 5 میلی متر مکعبی تقسیم شد، سپس هر کدام از موشها با تزریق داخل صفاقی کتامین/ زایلین (با دوز 10میلی گرم /کیلوگرم از وزن بدن) بیهوش شده و قطعات تقسیم شده تومور با روش جراحی در زیر پوست ناحیه فلانک راست آنها پیوند زده شد و جای جراحی با کلیپس مخصوص بخیه زده شد. حدود یک هفته بعد از پیوند رشد تومورها با چشم قابل دیدن بود.

اندازه گیری سیر رشد تومور در موشهای توموری:

بدین منظور یک هفته پس از توموری نمودن موش ها که قطر تومور آنها حدود 5میلی متر بود حجم تومور در دو جهت طول و عرض اندازه گیری شده و این عمل هر هفته دوبار تا ا نتهای کار با استفاده از کولیس ورنیه صورت گرفت و سپس حجم تومور با فرمول : عرض^2 × طول 1/2 محاسبه گردید.

بررسی و محاسبه حجم نهایی تومور در موش های توموری

جهت بررسی تغییرات مربوط به حجم تومور پس از پیوند و قبل از آغاز تجویز دوباره پروبیوتیک به موش ها حجم تومور با فرمول زیر محاسبه گردید

$$\frac{\text{حجم تومور در روز آخر}}{\text{حجم تومور در روز صفر}} \times 100$$

روش اندازه گیری گفته شده در بالا با استفاده از کولیس ورنیه مورد بررسی قرار گرفت ارزیابی حجم تومور هر هفته دوبار انجام شد و این عمل تا یک هفته پس از اخرین تجویز نیز ادامه یافت. بررسی وضعیت حجم تومور براساس درصد افزایش حجم تومور با فرمول مقابل

$$\frac{\text{قطر پای راست – قطر پای چپ}}{\text{قطر پای راست}} \times 100$$

محاسبه می شود.

بررسی **میزان** التهاب ناشی از DTH :ابتدا به میزان 20 میکرو لیتر از آنتی ژن اختصاصی تومور(تهیه شده از تومور اصلی) را در کف پای چپ و20 میکرولیتر PBSرا در کف پای راست هر موش از موشهای هر دو گروه پروبیوتیک و کنترل تزریق کرده و سپس قطر التهاب ناحیه تزریق در 24،48و72 ساعت بعد با استفاده از کولیس ورنیه ثبت شد و با استفاده از فرمول مقابل نتایج بررسی گردید.

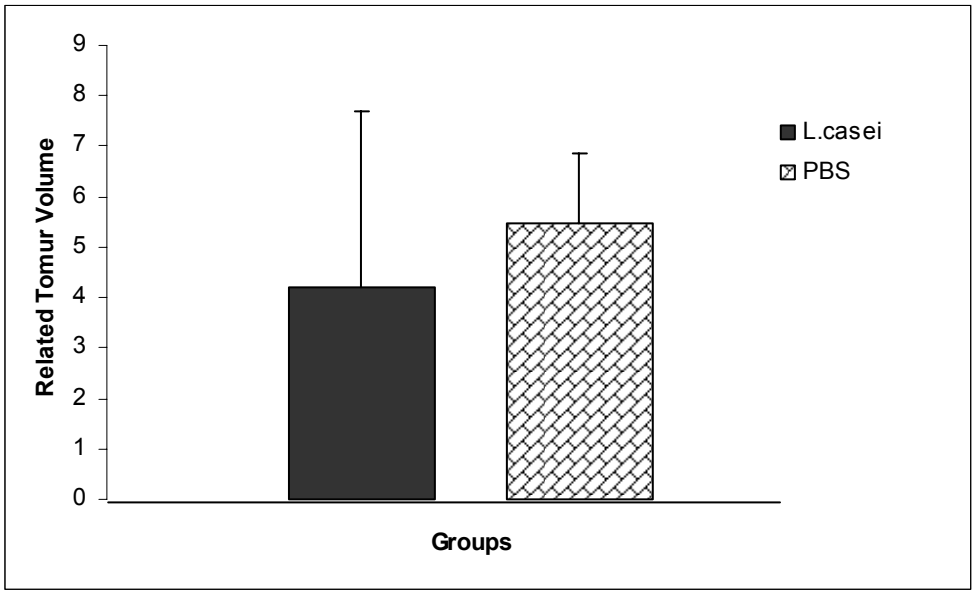
تهیه بافت توموری **فیکس** شده و **بررسی** های پاتولوژیک:

بدین منظور پس از کشتن موشهای هر گروه در پایان روز 44 مطالعه قطعات 5 میلیمتری از بافت تومور تهیه ودر فرمالین 37٪ بمدت 6 ساعت فیکس و برای تهیه لام پاتو لوژی و بررسی میزان نکروز داخل توموری به آزمایشگاه پاتولوژی بیمارستان بقیه ا... ارسال گردید.

آنالیز آماری:برای آنالیز آماری نمونه ها از آزمون ANOVA استفاده شد و بررسی و معنی داری داده ها $\acute{\alpha}$0/05 در نظر گرفته شد. SPSS (ver 13). داده ها با نرم افزار

نتایج سیر رشد وحجم نهایی تومور: نتایج حجم تومور نشان دهنده پایین تر بودن حجم نهایی تومور در موشهای گیرنده پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل یا گیرنده PBS بود(**شکل2**) .

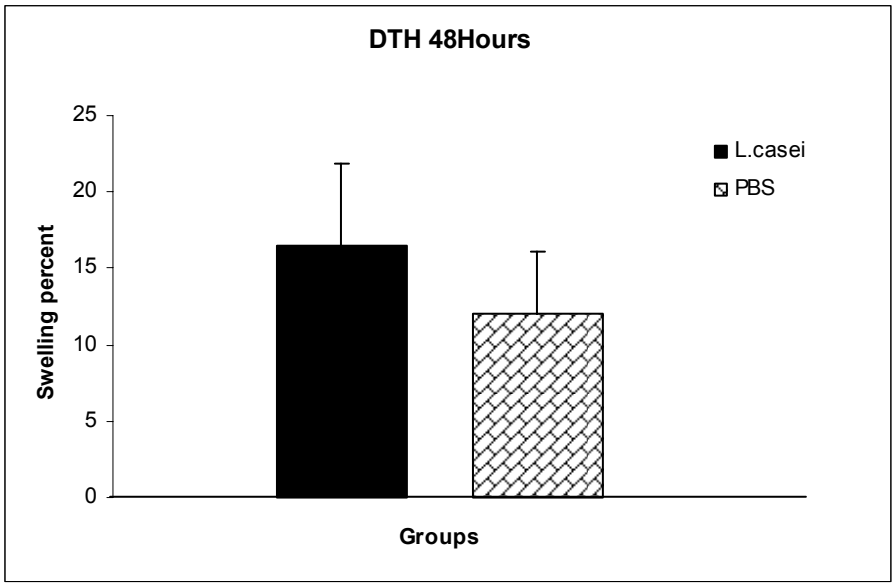
در واقع نتایج در گروه لاکتوباسیلوس کازئی نشان داد که سرعت رشد تومور در موشهای گیرنده این پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل کمتر می باشد که احتمالا این پدیده ناشی از اثر تقویت کننده گی لاکتوباسیلوس کازئی بر سیستم ایمنی این گروه از موشها در مقابله با این تومور می باشد.



شکل 2 بررسی حجم نهایی تومور: حجم تومور در دو جهت طول و عرض اندازه گیری شده و این عمل دو بار در هفته تا انتهای کار با استفاده از کولیس ورنیه صورت گرفت و سپس حجم تومور با فرمول ذکر شده در قسمت مواد و روشها محاسبه شد.

نتایج **بررسی** میزان التهاب ناشی از DTH در 48 ساعت:

پس ازتهیه آنتی ژن اختصاصی از بافت توموری یک موش مبتلا به آدنو کارسینومای پستان با روش سونیکیشن و دیالیز و تخلیص، این آنتی ژن در پای چپ موشهای سرطانی گیرنده لاکتوباسیلوس و PBS تزریق شد و برای کنترل از تزریق PBS تنها در پای راست آنها استفاده شد .طبق نتایج بدست آمده از این تست در 48 ساعت پس از تزریق آنتی ژن اختلاف قابل توجهی در التهاب موضعی پای چپ موشهای گیرنده پروبیوتیک در مقایسه با موشهای گروه کنترل وجود داشت (**شکل 3**)

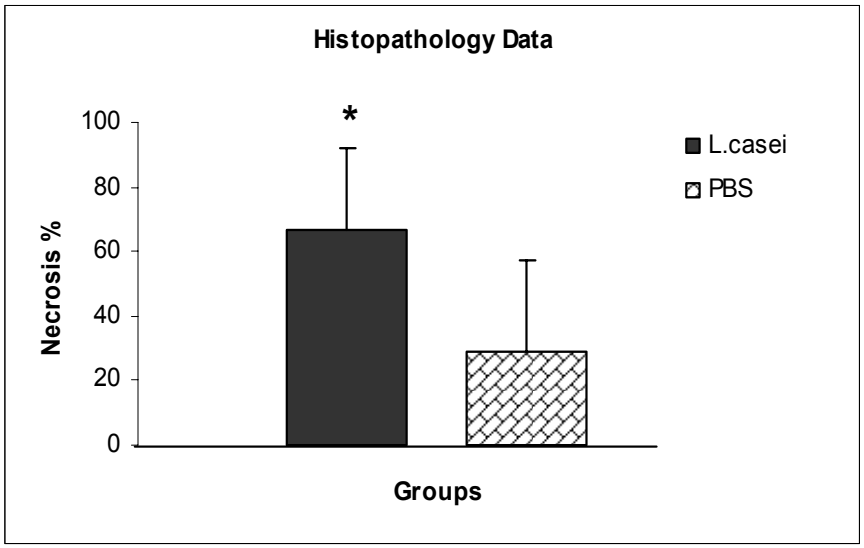


شکل 3 نتایج بررسی میزان التهاب ناشی از DTH در 48 ساعت: در ابتدا میزان 20 میکرو لیتر از آنتی ژن اختصاصی تومور(تهیه شده از تومور اصلی) را در کف پای چپ و20 میکرولیتر PBSرا در کف پای راست هر موش از موشهای هر دو گروه پروبیوتیک و کنترل تزریق کرده و سپس قطر التهاب ناحیه تزریق در24،48 و72 ساعت بعد با استفاده کولیس ورنیه ثبت شد.نتایج در گروه گیرنده پروبیوتیک در 48 ساعت پس از تزریق دارای اختلاف قابل توجهی نسبت به گروه کنترل می باشد.

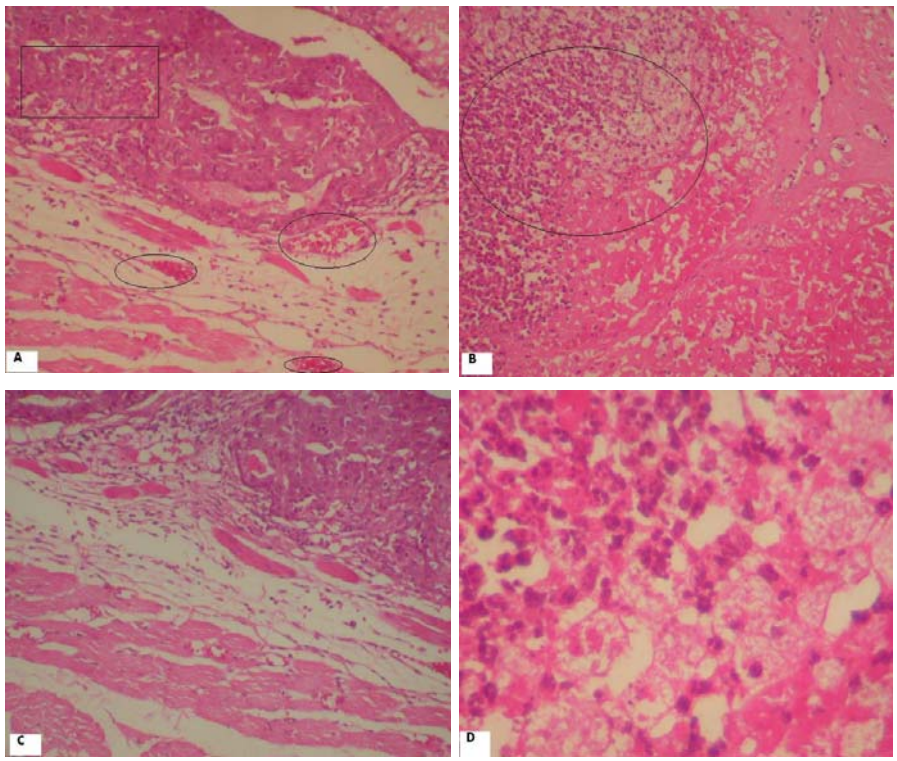
نتایج هیستوپاتولوژی بافت تومور در **دو** گروه:

پس از پایان دوره مطالعه بافت توموری ازبدن هر یک از موشها جدا و در فرمالین 37٪ فیکس و طبق روش کار معمول در آزمایشگاههای پاتولوژی از آنها لام میکروسکوپی تهیه وبا رنگ آمیزی H&E رنگ شده ونتایج میزان نکروز داخل بافت توموری بررسی شد .

این نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار ($P<0.005$) میزان نکروز داخل تومور در اثر تقویت پاسخهای ضد توموری در گروه گیرنده پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با گروه کنترل بود همچنین ارتشاح سلولهای دفاعی و تشکییل Giant cell ها و هیستوسیت ها در داخل بافت تومور گروه گیرنده پروبیوتیک بیشترمی باشد.آنالیز داده های پاتولوژی بر اساس میزان نکروز در شکل 4 وعکس لامها در شکل 5 مشاهده می شود.



شکل 4 نتایج میزان نکروز داخل توموری : نتایج پاتولوژی بیانگر افزایش معنی دار($P<0.005$) میزان نکروز داخل توموری در گروه گیرنده لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به گروه کنترل می باشد که عکس های موجود در شکل 5 میزان نکروز را نشان میدهد.



شکل5 نتایج هیستوپاتولوژی: لامهای پاتولوژی بر اساس روش رایج در آزمایشگاههای پاتولوژی از بافت تومور فیکس شده در فرمالین 37٪ تهیه وبا رنگ آمیزی H&E رنگ گردید.A: در این عکس قسمتهای مشخص شده با دایره نشان دهنده رگ های اطراف تومور هستند که داخل آنها از RBC پر شده که در گروه کنترل بیشتر به چشم می آیند و وظیفه آنها خونرسانی و تغذیه سلولهای توموری می باشد ضمنا ناحیه نکروز شده (منطقه مشخص شده با کادر مستطیل) و ارتشاح سلولهای ایمنی و تشکیل Giant cell ها در مقایسه با گروه گیرنده پروبیوتیک بسیار کمتر می باشد.B: در این عکس منطقه نکروز شده داخل تومور با ارتشاح سلولهای هیستوسیتی در گروه پروبیوتیک دیده می شود که در مقایسه با گروه کنترل منطقه نکروز شده در گروه گیرنده پروبیوتیک وسیعتر می باشد و تعداد سلولهای هیستوسیت و تشکیل giant cell ها که مسئول پاکسازی بقایای موجود از عملکرد سایتولیز سلولهای توموری توسط سلولهای ایمنی می باشند در این گروه بیشتر است ضمن اینکه رگزایی در اطراف تومور در این گروه بسیار کمتر به چشم می خورد.C: در این عکس رشد سلولهای توموری و رگ های اطراف آن دیده میشود.D: دراین عکس تشکیل Giant cell ها و هیستوسیت ها ومنظره نکروز سلولهای توموری با بزرگنمایی بیشتر دیده می شود.

بحث :

سرطان پستان یکی از شایعترین بد خیمی های زنان در جهان می باشد که شیوع متفاوتی در بین ملل مختلف دارد،بالاترین شیوع این بدخیمی مربوط به زنان سفید پوست در آمریکا و کمترین آن مربوط به زنان چینی وژاپنی می باشد (1).بسیاری از مطالعات صورت گرفته روی بیماران مبتلا به سرطان پستان حاکی از کاهش پاسخ های ایمنی از جمله پاسخ افزایش حساسیت تاخیری،عملکرد سایتو لیتیک،کاهش تکثیر در سلولهای ایمنی و در نتیجه کاهش سایتوکائینها در اثر ابتلا به این سرطان می باشد که در حقیقت بیانگر یک وضعیت ایمنو ساپرشن می باشد(6).بنابراین در چنین شرایطی استفاده از عوامل تقویت کننده سیستم ایمنی میتواند در تعیین پیش آگهی بهتر در این سرطان بسیار کمک کننده باشد.باکتریهای خانواده لاکتوباسیل به طور رایج بعنوان پروبیوتیک در ماست وسایر لبنیات استفاده میشوند. ویژه گیهای تنظیم کننده گی و تحریک کننده گی این باکتریها بر روی سیستم ایمنی میزبان به خوبی در مطالعات گذشته مشخص گردیده.(7و8) در واقع این دسته از باکتری ها دارای تاثیرات مثبت زیادی در بدن هستند که از آن جمله می توان به جلوگیری از کارسینوژنزیس و رشد تومور اشاره کرد. (13) یکی از مسائلی که در مورد لاکتوباسیلوسها و وجود آنها به عنوان فلور گوارشی درانسان و بسیاری از حیوانات مطرح می باشد اینست که خواص تقویتی وتحریکی این عوامل فقط محدود به ایمنی مخاطی نبوده بلکه این باکتریها میتوانند با مکانیسم های مختلف سیگنالهای لازم جهت تحریک و تقویت سیستم ایمنی مرکزی را نیز مخابره کنند و در این رابطه گزارشات زیادی مبنی بر کاربرد این عوامل در مقابله با عفونتهای مختلف ، سرطانها و سایر ناهنجاری های ایمنولوژیک وجود دارد(14) در مطالعات گذشته نشان داده شده که سایتوکائینهای القائی بواسطه لاکتو باسیل ها دارای نقش عمده ای در القا خواص تنظیم کننده گی این عوامل بر روی سیستم ایمنی هستند(15).بر طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر و با توجه به نوع پاسخ مورد نیاز بدن در مقابله با

تومور که در واقع پاسخهای مربوط به لنفوسیتهای Th1 ، T سلهای سایتو توکسیک و دیگر مکانیسم های سایتولیز سلولهای توموری از جمله فعالیت NK سلها می باشد می توان این برداشت را از اثر پروبیوتیک برکارآمدی بیشتر پاسخهای ایمنی و وضعیت دفاعی بدن در مقابل تومور داشت که افزایش میزان التهاب موضعی در تست DTH در موشهای گیرنده پروبیوتیک می تواند دلیلی بر فعالیت بیشتر سلولهای Th1 در موشها باشد چرا که پاسخ افزایش حساسیت تاخیری DTH نسبت به آنتی ژنی که بدن در ابتدا با آن مواجه بوده و پس از مدتی دوباره با آن برخورد میکند در واقع یک نوع پاسخ ثانویه ناشی از عملکرد سلولهای Th1 خاطره ای می باشد که این التهاب کمی پس از تماس دوباره با آنتی ژن آغاز شده و معمولا در 48 ساعت به اوج رسیده و پس از 72 ساعت فرو کش می نماید(16).و تاثیر تجویز پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بر افزایش التهاب موضعی علیه آنتی ژن اختصاصی تومور ناشی تقویت پاسخ ایمنی سلولی وابسته به لنفوسیتهای Th1 می باشد.در مورد نتایج بدست آمده از بررسی های پاتولوژی باید گفت که صرف نظر از نکروز ایجاد شده در مرکز تومور در اثر رشد در اطراف و ایسکمی در مرکزبافت توموری که این در آنالیز داده های پاتولوژی حذف شد ولی میزان نکروز ناشی از عملکرد سلولهای دفاعی بدن در بافت تومور موشهای گیرنده لاکتوباسیلوس کازئی بطور چشمگیری بیشتر از موشهای کنترل بود.بعلاوه ارتشاح سلولهای ایمنی از جمله لنفوسیتها و سلولهای پلیمورفونوکلئر در داخل تومور موشهای گیرنده پروبیوتیک نیز حاکی از تقوییت عملکرد سیستم ایمنی در این موشها بود که در عکس های بالا وجود هیستوسیتها و تشکیل Giant cell ها و ماکروفاژهای کف آلود در گروه گیرنده پروبیوتیک (عکسهای C,D)تائیدی بر این ادعا می باشد. همچنین داده های مربوط به حجم نهایی تومورهم نشان دهنده کاهش قابل توجه حجم تومور در موشهای گیرنده پروبیوتیک می باشد که این نیز می تواند تائیدی بر فعال شدن و کارآمدی سیستم ایمنی در مقابله با تومور و جلوگیری از رشد آن در نتیجه تجویز لاکتوباسیلوس کازئی باشد.با توجه به مجموعه نتایج این مطالعه باید گفت میتوان به نتایج خوبی از انجام مطالعات انسانی استفاده از این پروبیوتیک درتقویت سیستم ایمنی مبتلایان به این نوع سرطان امیدوار بود، ولیکن هنوز هم نیاز به مطالعات بیشتر برای شناخت دیگر مکانیسمها و اثرات دقیقتر پروبیوتیکها بر پاسخهای ایمنی در مقابله با تومورها وجود دارد.

تقدیر و تشکر: این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد .....6954....مورخ ...27../..../.2../...1387 می باشد .

Reference:

1- Willett, W., The search for the causes of breast and colon cancer. Nature, 1989. 338(6214): p. 389-94.

2-Ahmedin J, Taylor M, Alicias. Cancer statistic. Cancer journal for clinicans.

2003; 53-26

3 –Breast cancer facts&figures.American society,Inc.2003-2004

4- Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harrirchi I et al.

breast cancer in iran: an epidemiological review. Breasty. 2007 Jul-Aug;

13(4): 383-91 Review.

5- Stewart, T.H. and G.H. Heppner, Immunological enhancement of breast cancer. Parasitology, 1997. 115 Suppl: p. S141-53.

6-Marrogi, A.J., et al., Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. Int J Cancer, 1997. 74(5): p. 492-501.

7– Drisko JA, Giles CK, Bischoff BJ. Probiotics in health maintenance and disease prevention. Altem med Rev. 2003 may; 8(2): 143-55. Reviwe Immunology, 1988. 63(1): p. 17-23.

8 –Schrezenmeir, J., de Vrese, M., 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics.Approaching a definition. The American Journal of Clinical Nutrition .73,362S–364S.

9- C.Bujalancel, E.Moreno, M. Jimenez-Valera, A.Ruiz. Bravo. A probiotic Strain of lactobacillus plant arum stimulates lymphocyte responses in immunologic ally intact and immunocompromised mice: 2007; 23-34.

10– Kirjavainen, P.V., El-Nezami, H.S., Salminen, S.J., Ahokas, J.T., Wright, F.A.,1999. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli On mouse lymphocyte proliferation. FEMS Immunology and Medical Microbiology 26, 131–135.

11- Asano, M., E. Karasawa, and T. Takayama, Antitumor activity of Lactobacillus casei (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). J Urol, 1986. 136(3): p. 719-21.

12- McIntosh, G.H., P.J. Royle, and M.J. Playne, A probiotic strain of L. acidophilus reduces DMH-induced large intestinal tumors in male Sprague-Dawley rats. Nutr Cancer, 1999. 35(2): p. 153-9.

13- de Roos, N.M. and M.B. Katan, Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr, 2000. 71(2): p. 405-11.

14- Perdigon, G., R. Fuller, and R. Raya, Lactic acid bacteria and their effect on the immune system. Curr Issues Intest Microbiol, 2001. 2(1): p. 27-42.

15- Levings, M.K., et al., The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. Int Arch Allergy Immunol, 2002. 129(4): p. 263-76.

16- de Waard R, Garssen J, Snel J, Bokken GC, Sako T, Veld JH, Vos JGEnhanced antigen-specific delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin G2b responses after oral administration of viable Lactobacillus casei YIT9029 in Wistar and Brown Norway rats. Clin Diagn Lab Immunol. 2001 Jul;8(4):762-7.

پروبیوتیکها و کاربرد آنها در آبزی پروری

در ایران رشد جمعیت از طرفی و افزایش آگاهی های عمومی در مورد مزایای مصرف آبزیان از سوی دیگر موجب بالا رفتن تقاضا و مصرف بیشتر آبزیان در سالها ی اخیر تا حدود 7/7 کیلوگرم مصرف سرانه شده است، اگر چه این مقدار مصرف با میانگین مصرف جهانی یعنی 13/5 کیلو گرم به ازای هر نفر در سال فاصله زیادی دارد. بخش آبزی پروری در کنار این رشد همواره با مشکلاتی روبرو بوده است که از آن جمله می توان به تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماریها و .... اشاره نمود.

به طور مثال در سالهای اخیرتأثیرات مضر باکتری Streptococcus در پرورش بسیاری از گونه های ماهی آب شیرین و دریایی دیده شده است .. در آبزی پروری روشهای قدیمی برای درمان پاتوژنهای عفونت زا شامل تعداد محدودی آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی می باشد که علاوه بر اثرات حاشیه ای و هزینه بالا موجب انباشتگی مواد شیمیایی در محیط و ماهی می شود. لذا داشتن انواعی از افزودنیها که ضمن حفظ ویژگیهای مطلوب، فاقد اثرات سوء بهداشتی و زیست محیطی باشند، سالهاست توجه همه پژوهشگران را در سطح جهان به

خود معطوف داشته است. امروزه پروبیوتیک ها یا مکملهای میکروبی در مقابل آنتی بیوتیک ها قرار می گیرند. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های مکملی نظیر باکتریها، قارچ ها و مخمرها می باشند که با متعادل نمودن فلور میکروبی دستگاه گوارش سلامت میزبان را افزایش می دهند.

براساس تعریف Douliiet و Longdon پروبیوتیک ها غذاهای کمکی اند که آنزیم های جانبی آنان می تواند باعث افزایش فرایند هضم شود. این میکروارگانیسم ها نه تنها باعث کاهش میکروبهای بیماریزا در محیط و موجود زنده می شوند، بلکه با ایجاد و تقویت میکروارگانیسم های مفید موجود در دستگاه گوارش، موجبات سلامتی و یا افزایش میزان رشد را در موجودات زنده فراهم می آورند.

انتخاب پروبیوتیک ها برای آبزی پروری معمولاً براساس آنتاگونیست بودن آنها نسبت به عوامل بیماریزا می باشد. اگر چه مواردی مانند رشد، اتصال به موکوس روده و تولید ترکیبات مفید نیز باید در نظر گرفته شود.

اثرات مثبت پروبیوتیک ها موجب شده که شرکت های تجاری بزرگی به تهیه و ساختن پروبیوتیک ها بپردازند، به طوری که امروزه بسته های تجاری این محصولات توسط شرکت های بزرگ تهیه می شوند که از جمله آنها میتوان به Aqualase ، Epicin ، Protexcin ، Miqrograd، Alken-Murray اشاره نمود که هر یک از بسته های فوق دارای میکروارگانیسمهای متفاوت از گروه باکتریها (باکتریهای گروه لاکتیک ، باسیلوسها ، سودموناسهای غیر بیماریزا و ...) و مخمرها (خصوصاً ساکارومیسس) می باشند.

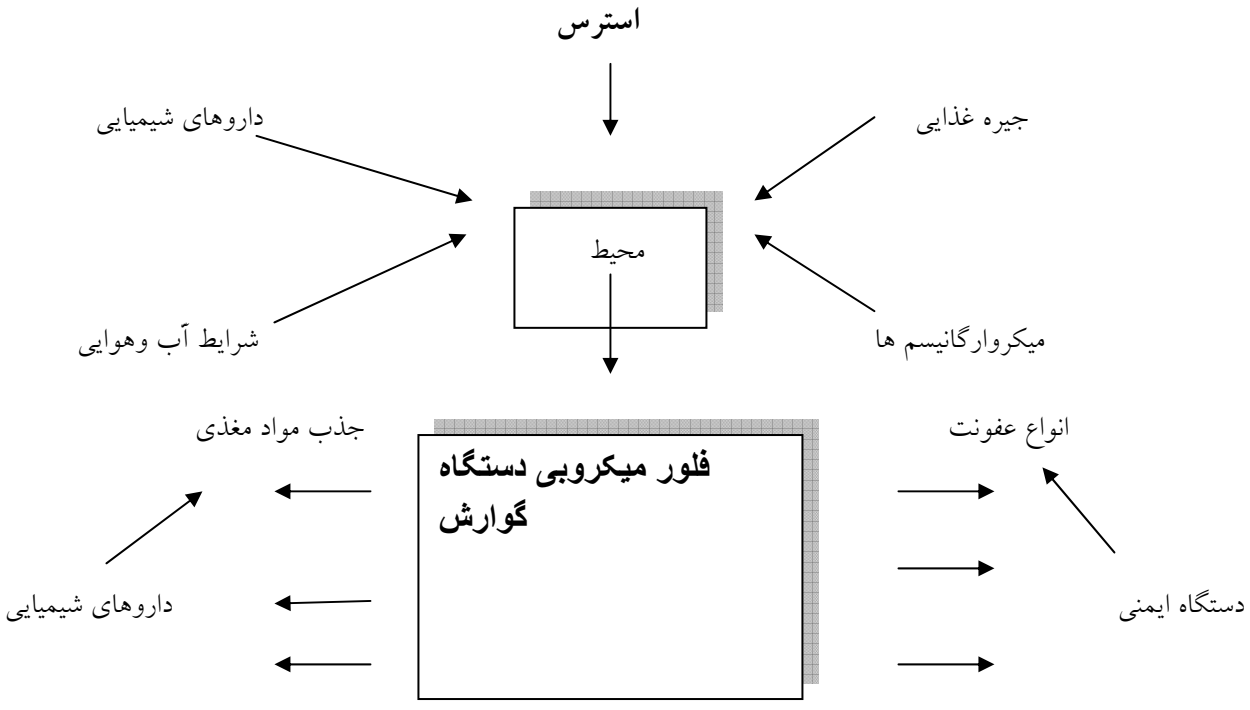
مضرات استفاده از آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی

عمده ترین خطری که صنعت آبزی پروری را تهدید می کند، عامل بیماری می باشد. در تمامی زمینه های این صنعت از پرورش ماهیان سردابی و گرمابی تا پرورش میگو این موضوع اهمیت دارد اگرچه این امردر زمینه پرورش میگو مصداق بیشتری پیدا می کند به عنوان مثال در فیلیپین بیماری ناشی از ویبریوی درخشان باعث کاهش زیادی در تولید میگوی این کشور درسال 1996 شده و بسیاری مزارع تولید خود را از دست دادند. گونه های بیماری زای این مزارع به هر نوع آنتی بیوتیک استفاده شده مقاوم بودند و یا در تایلند پرورش دهندگان با وجود این که از آنتی بیوتیکها در تمام غذاها استفاده می کردند باز هم شاهد افزایش زیادی در مرگ و میر توسط بیماری ویبریوزیس بودند. با توجه به این که بیماریهای آبزیان به دلیل زیست جاندار در محیط آبی اغلب دیر تشخیص داده می شوند و معمولاً به دلیل تراکم بالا احتمال سرایت بیماری بیشتراست، هنگامی که یک بیماری در مزرعه شایع شد معمولاً تلفات، سنگین و اجتناب ناپذیر است. به همین دلیل در زمینه پیشگیری از بیماری باید دقت کرد. متأسفانه این موضوع در کشور ما آنچنان که باید مورد توجه قرار نمی گیرد و یا اگر کسی به آن توجه کند راه آن را در استفاده از آنتی بیوتیک و به طور کلی مواد شیمیایی می داند. هنگامی که از آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی استفاده می شود، بخصوص درهنگام عدم رعایت مقدار دوز مجاز، تمامی افراد یک گونه از بین نمی روند و گونه های مقاوم می مانند و به دلیل عدم وجود رقبای غذایی به سرعت به رشد وتکثیر خود ادامه داده و در اثر گذشت زمان به گونه غالب تبدیل می شوند. این عمل نه تنها دراستخر های پرورشی خطرناک است بلکه ممکن است به مرور زمان باعث آلودگی اکوسیستم شود و آبهای ساحلی را تحت تاثیر قرار دهد.

رابطه عوامل محیطی و میکرو فلور دستگاه گوارش

در اکثر موارد، زمانی که صحبت از میکروارگانیسم ها می شود، آنها موجوداتی مضر و زیانبار تصور می شوند. چنین تصوری نمی تواند صحیح باشد، چرا که تعداد باکتری های غیر بیماری زا بمراتب بیش از باکتریهای بیماریزا است و بسیاری ازگونه های غیربیماریزای باکتریها نه تنها مفیدند، بلکه برای ادامه حیات ضروری هستند. یک دسته از این باکتریهای سودمند، آنهایی هستند که در دستگاه گوارش حیوانات زندگی می کنند. این میکروارگانیسم ها تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می گیرند (شکل1).

استرسهای محیطی، نوع جیره غذایی، داروها، سموم شیمیایی و همچنین شرایط آب و هوایی از جمله عواملی هستند که بر رشد میکرو فلور روده تاثیر گذارند .



شکل 1: رابطه عوامل محیطی و میکروفلور دستگاه گوارش

طی سالهای اخیر استفاده از مواد افزودنی در خوراک دام و طیور بشدت مورد توجه متخصصین تغذیه و دام واقع شده است، یکی از مهمترین افزودنی ها محصولاتی است که به طور زنده و مستقیم در جیره به مصرف می رسند و در تجارت به نام پروبیوتیک شناخته شده اند واژه پروبیوتیک از کلمه یونانی پروبیوس گرفته شده و برخلاف آنتی بیوتیک که که به معنای ضد حیات است در لغت به معنای حمایت از حیات می باشد.

تعریف پروبیوتیک

واژه پروبیوتیک واژه ای یونانی است که به معنای «برای زندگی» می باشد. طی سالیان متمادی بکارگیری این واژه، معنای آن همواره در حال تغییر بوده است . این واژه برای نخستین بار توسط Lilly و Stillwell برای مواد مترشحه بوسیله میکرو ارگانیسم ها بکار گرفته شد که موجب تحریک رشد در میکروارگانیسم های دیگر می شوند. این کلمه بار دیگر توسط Parker درسال (1974) معرفی شد. مطابق این تعریف، پروبیوتیکها میکروارگانیسم ها و موادی بودند که در تعادل میکروبی روده شرکت داشتند.

براساس تعریف Fullller (1987) پروبیوتیک مکمل غذایی میکروبی زنده است که با بهبود تعادل میکروارگانیسم های روده، اثرات سودمندی را برای میزبان دارد. دیگر محققان تعریف گسترده تری را بکار می برند. برای مثال Gram و همکاران (1999) پیشنهاد کردند که پروبیوتیک مکمل میکروبی زنده است که اثرات مفیدی را بر حیوان میزبان به وسیله بهبود توان میکروبی اش، می گذارد. دراین تعریف، تاثیر مثبت به تغذیه منحصر نشده است (Salminen *et al.*, 1999) پروبیوتیک را به عنوان هر گونه مواد میکروبی (اما نه لزوماً زنده) یا اجزای این سلول ها با اثر سودمند بر سلامت میزبان، مورد توجه قرار می دهند. دراین تعریف نیاز برای زنده بودن میکروارگانیسم در ارتباط با تغذیه نادیده گرفته شده است. براساس مشاهداتی میکروارگانیسم ها قادر به اصلاح ترکیب باکتریایی آب و رسوب آن می باشند (Moriarty, 1999) پیشنهاد کردند که افزایش پروبیوتیک ها به محیط آبی سبب بهبود شرایط پرورش آبزی مورد نظرمی شود. براساس بررسی های صورت گرفته ، پروبیوتیکها نمی توانند از جمله عوامل کنترل کننده بیولوژیک محسوب گردند زیرا کنترل بیولوژیک عبارت است از استفاده از دشمنان طبیعی یک جاندار مضر، به منظور کاهش آسیب های ایجاد شده بوسیله آن، این درحالی است که پروبیوتیکها میکروارگانیسم های مضر و یا عوامل بیماریزا را مورد حمله قرار نداده و تنها منجر به کاهش آسیب های ایجاد شده توسط این عوامل در میزبان از طریق رقابت، تولید سوبسترا به منظور ممانعت از رشد این عوامل ویا اتصال به آنها می گردد. بنابراین تعریف، پروبیوتیکها یک فاکتور بهبود دهنده وضعیت سلامت آبزی محسوب می شوند که از این طریق قادر به اعمال تاثیر مثبت بر روی رشد و سیستم ایمنی بدن می باشند.

پروبیوتیکها نخستین بار در مزارع پرورش آبزیان بوسیله Kozasa (1986) مورد استفاده قرار گرفتند وکاربرد آن ها درمزارع پرورش ماهی در سالهای اخیر افزایش چشمگیری را نشان می دهد. کاربرد پروبیوتیکها در پرورش آبزیان نه تنها دردستگاه گوارش نقش مهمی را ایفامی نماید بلکه شرایط فیزیکوشیمیایی آب اطراف را هم بهبود می بخشند . موجودات آبزی با موجودات خاکزی برای قبول پروبیوتیک ها جهت رشد کاملاً متفاوت
می باشند. انسان و موجودات خشکیزی در کیسه جنینی در داخل آمنیون رشد می کنند در صورتی که اشکال لاروی اکثر ماهی ها و نرم تنان در مراحل اولیه رشد در محیط خارج رها می شوند. این لاروها به میزان زیادی در معرض اختلالات مربوط به میکروبیوتای معده – روده ای قرار می گیرند، زیرا اگرچه محیط گوارش و نیز سیستم ایمنی آنها هنوز کامل نشده است ، تغذیه را شروع می کنند، بنابراین تیمار پروبیوتیکی خصوصاً در مراحل لاروی مطلوب می باشد. ویبریو و سودوموناس ها معمول ترین گونه های باکتریایی موجود در لوله گوارش ماهی های دریایی می باشند. آئروموناسها ، پسودوموناس ها و آنتروباکترها در ماهیان آب شیرین غالب هستند.

تقسیم بندی پروبیوتیک ها

پروبیوتیک ها را براساس معیارهای مختلفی تقسیم بندی می نمایند. پروبیوتیک ها به طور عمده به سه گروه تقسیم ی شوند .

1) باکتریایی 2) قارچی 3) مخمری

در بین این گروهها پروبیوتیک های باکتریایی عمده ترین گروهی هستند که در آبزی پروری مورد استفاده واقع شده اند.

معیارهای انتخاب پروبیوتیک ها

هدف اولیه واصلی از بکارگیری پروبیوتیکها ایجاد و برقراری رابطه و تناسبی مطلوب بین میکروارگانیسم های مفید و میکروارگانیسم های بیماریزای تشکیل دهنده فلور دستگاه گوارش می باشد.

ویزگی های اختصاصی پروبیوتیکها شامل:

1)بیماریزا و مسمومیت زا نباشد.

2)هدف اختصاصی و مشخص داشته باشد.

3)تأثیر مشخص و واقعی داشته باشد.

4)پایداری داشته باشد.

5)قابلیت تکثیر و تولید در مقیاس تجاری را داشته باشد.

6)توانایی اتصال به سلول های پوششی روده را دارا باشد.

شیوه های عمل پروبیوتیکها

با توجه به سابقه اندک استفاده از پروبیوتیکها در آبزی پروری، مکانیسم های فعالیت آنها هنوز به وضوح مشخص نشده است. اما با توجه به تحقیقات صورت گرفته بر روی پروبیوتیکهای مورد استفاده در زمینه انسانی و کشاورزی چندین شیوه عمل مشخص شده است. اگر چه که هر یک از شیوه ها ویژگی های اختصاصی خود را دارند ولی مکانیسم های اکولوژیک میکروبی در آنها یکسان بوده و همین موضوع امکان تعمیم مدارک آزمایشات به دست آمده را تا اندازه ای بوجود می آورد. موضوعی که در این جا اهمیت دارد این است که ممکن است سویه ای دارای توانایی ذاتی در تولید ترکیبات بادارنده به میزان کافی وحتی تحت شرایط حاکم بر روده باشد، اما با این وجود اگرسویه مورد نظر بوسیله میزبان بلع شود این توانایی بروز نمی کند ، همچنین اگر پس از بلع، پروبیوتیکها قادر به تکثیر در روده نباشند بعید است که اثرات قابل توجهی اعمال نمایند مگر آنکه به طور منظم به جیره غذایی اضافه شوند.

مکانیسم عملکرد پروبیوتیک ها

پروبیوتیکها می توانند به طور مستقیم و غیر مستقیم بر آبزیان تأثیر بگذارند. در حالت اول با تغییر در تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش آبزی باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می شوند و با ترشح ویتامین و مواد مغذی وکمک به جذب مواد غذایی سبب رشد می گردند .

در حالت دوم با بهبود کیفیت آب و محیط زیست آبزی باعث کاهش استرس می شوند که خود باعث کاهش احتمال بروز بیماری می شود. چرا که بین مقاومت میزبان، عوامل بیماری زا و محیط پرورش رابطه ای سه گانه برقرار است که هر یک دیگری را تحت تاثیر قرار می دهد.

به طور کلی روش عمل پروبیوتیکها شامل :

1) حفظ جمعیت میکروبی مفید در دستگاه گوارش

الف- رقابت برای اتصال به جایگاههای موجود در سلولهای بافت پوششی روده

ب- رقابت برای دریافت مواد مغذی یا سوبسترا (کربن، ازت، عناصر معدنی)

ج- چسبیدن به میکروارگانیسم های بیماریزا و کمک به حذف آنها از بدن میزبان

د- تولید ترکیبات ضد باکتریایی

2) افزایش میزان دریافت غذا و بهبود هضم آن

الف- متابولیسم مواد مغذی از قبیل کربوهیدرات ها، پروتئین ها و چربی ها

ب- افزایش ماندگاری مواد مغذی (چربی، ازت، کلسیم، فسفر، مس، منگنز)

ج- ساخت ویتامین ها

د- تحریک اشتها

3) تغییر در متابولیسم باکتریایی

الف- فعالیت آنزیمهای گوارشی

ب- فعالیت آنزیم های باکتریایی

ج- کاهش تولید آمونیاک

4) تحریک سیستم ایمنی

الف- تحریک تولید پادتنها

ب- افزایش سطوح پروتئین سرم و بالا رفتن نسبت گلبولین ها به آلبومین ها

د- افزایش تعداد گلبولهای سفید

ه- افزایش فعالیت گرانولوسیتهایT

5) خنثی نمودن انتروتوکسین ها

بعضی از سمومی که بوسیله باکتریها تولید می شوند، تحت تاثیر مواد تولید شده توسط پروبیوتیکها خنثی می گردند.

متأسفانه، اطلاعات درباره روش عمل پروبیوتیکهای استفاده شده در آبزی پروری، ناقص است. مکانیسم عمل شامل بهبود تغذیه به وسیله مسمومیت زدایی ترکیبات مضر در غذا و دناتوره کردن مواد غیر قابل هضم در رژیم غذایی بوسیله آنزیم های تجزیه کننده شامل آمیلازها و پروتئازها و تولید ویتامین ها همانند بیوتین و ویتامین B_{12}، تولید ترکیبات مهاری و تحریک سیستم ایمنی میزبان می باشد. بر طبق مطالعات Iranto و Austin در سال 2002 مشخص شد تغذیه با پروبیوتیکهای گرم مثبت و گرم منفی منجر به تحریک ایمنی سلول بیشتر

از ایمنی خون می شود، همچنین افزایش در تعداد گلبولهای قرمز، ماکروفاژها و لنفوسیتها دیده شده و فعالیت لیزوزیم در 2 هفته تغذیه با پروبیوتیک، بالا می رود در این حالت پروبیوتیکها همانند واکسن های خوراکی عمل می کنند.

اشکال و روش تجویز پروبیوتیک ها

پروبیوتیکها را می توان به طرق مختلف برای حیوانات آماده کرد.

1) افزودن به رژیم غذایی دستی 2) حمام کردن

3) افزودن به آب پرورش 4) افزودن از طریق غذای زنده

تجویز خوراکی به اشکال قرص، کپسول، فراورده های تخمیری شیر و به صورت پودر مخلوط با جیره غذایی می باشد. هر روش تجویز به روش ساخت فراورده ها، مصرف کننده خاص و ویژگی های میکروارگانیسم های پروبیوتیکی بستگی دارد. پس از تجویز پروبیوتیک، میکروارگانیسم ها باید در برابر شرایط موجود در قسمت مورد نظر در بدن مقاوم باشند، به طور مثال میکروارگانیسم های موجود در یک پروبیوتیک با مصرف خوراکی باید، در برابر آنزیم های موجود در محوطه دهانی (آمیلاز و لیزوزیم)، آنزیمهای معده (پپسین و لیپاز) و pH پایین و آنزیم های موجود در صفرا، شیره لوزالمعده و مخاط روده کوچک مقاوم باشند. بنابراین برای سویه های بکار گرفته شده در فراورده های پروبیوتیک با مصرف خوراکی، مقاومت در برابر آنزیم های دستگاه گوارش و دهان از مهمترین معیارهای انتخاب وگزینش می باشد. ساده ترین و متداولترین روش استفاده، کاربرد پروبیوتیکها به صورت مخلوط با غذا یا آب استخر می باشد. این پروبیوتیکها به صورت تک گونه ای یا ترکیبی از چند گونه عرضه می شوند.

اهمیت کاربرد پروبیوتیک ها در پرورش آبزیان

به منظور مبارزه با مشکلات موجود در آبزی پروری از جمله تغییرات کیفیت آب، شیوع بیماریها و افزایش فعالیت آنزیم های موجود در ماهی و میگو سالهای اخیر استفاده از پروبیوتیکها به عنوان راه حل کارآمدتری در مقایسه با سایر راه کارها انتخاب شده است. فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش موجودات خشکی زی و انسانها تقریبا ثابت
می باشد ، میکرو فلور دستگاه گوارش موجودات آبزی شامل تعداد زیادی از میکروارگانیسم های مختلف می باشد، حضور این جمعیت کثیر به دلایل زیر قابل توجه است :

1) کمک به هضم مواد غذایی

2) کمک به ساخت و جذب ویتامینها

3) تحریک سیستم ایمنی

4) تجزیه سلولز و سایر پلی ساکارید ها.

این فلور میکروبی به علت خونسرد بودن و تبعیت دمای بدن از دمای آب محیط اطراف دائماً در حال تغییر می باشد نه تنها تغییرات دما، تغییرات شوری نیز قادر به تغییر فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش آبزیان می باشد. بعلاوه در کنار شرایط زیست محیطی، نوع غذای دریافتی بوسیله آبزیان نیز قادر به تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش آنها خواهد بود. بنابراین استفاده از میکروارگانیسم های آنتاگونیسم با عوامل بیماریزا، که موجب بهبود وضعیت سلامت جاندار می شوند، به عنوان پروبیوتیک محسوب شده و منجر به تغییرات مناسب فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی خواهند شد. این امر در نهایت منجر به افزایش تولید و افزایش مقاومت ماهیان و سایر آبزیان در برابر استرسهای رایج در آبزی پروری می گردد. تکنیک استفاده از پروبیوتیکها به تازگی جایگاه خود را در آبزی پروری پیدا کرده و تقریباً در تمامی جنبه های آن کاربرد دارد .

1) کاربرد در هچریها برای حفاظت تخم و لارو ماهیها

2) کاربرد در مورد ماهیان پرورشی و مولدین

3) کاربرد در هچریهای میگو

4) کاربرد در مزارع پرورش میگو

5) کاربرد در زمینه ماهیان زینتی و آکواریومی

6) کاربرد در زمینه پرورش دیگر سخت پوستان از جمله خرچنگها

7) کاربرد در زمینه پرورش دو کفه ای ها

8) کاربرد در تولید غذای زنده از جمله جلبکهای تک سلولی، آرتمیا و روتیفر

پروبیوتیک های ارزیابی شده برای استفاده در آبزی پروری

دامنه ای از پروبیوتیکها برای استفاده در آبزی پروری مورد آزمایش قرار گرفته اند که شامل باکتری های گرم مثبت و گرم منفی، باکتریو فاژها، مخمرها و جلبک های تک سلولی می باشند. امروزه پروبیوتیکها در غذای دستی، غذای زنده آرتمیا و روتیفر و در بهبود آب استفاده می شوند.

باکتری های گرم مثبت

باکتری های گرم مثبت هوازی تشکیل دهنده اندوسپور، یعنی باسیلوس، به عنوان پروبیوتیک ارزیابی شده اند، که باعث بهبود کیفیت آب به وسیله اثر برترکیب جمعیت های میکروبی آبزی می شود. بدین ترتیب باسیل ها در محیط های آبی با عوامل بیماریزای مؤثر مخالفت می کنند. استفاده از پروبیوتیکها موجب کاهش استفاده از ترکیبات ضد میکروبی به ویژه آنتی بیوتیک ها در آبزی پروری شده است و اشتها یا عملکرد رشد گونه های اهلی را بهبود می بخشد. به طور مثال Moriarty و همکارانش در سال 1998 از ذخیره های تجاری حاوی باسیلوس در حوضچه های حاوی گربه ماهی و میگو استفاده کردند. همچنین Hirata و همکارانش در سال 1998 کشت ترکیبی حاوی باسیلوس، برای بهبود عملکرد روتیفر *Brachionus plicatilis* در آب استفاده کردند. باسیلوس بقای لارو را بهبود
می بخشند، جذب غذا را به وسیله بالا بردن سطوح پروتئاز افزایش داده و رشد بهتری را نتیجه می دهد. همچنین پروبیوتیک، تعداد باکتری های پاتوژنی مورد تهدید در روده را کاهش می دهد.

Liu , Chang در سال 2002 از *Enterococcous faecium , Bacillus toyai* (SF68)درمحصولات تجاری استفاده کردند تا *Edward siellosis* در مار ماهی اروپایی *Anguilla anguilla* کاهش یابد. مطالعات نشان داده که(SF68) *E.faecium* مرگ و میررا در مار ماهی کاهش می دهد. *E.faecium* همچنین هنگامی که در تغذیه گربه ماهی استفاده می شود باعث بهبود رشد می گردد. همچنین اینتروکوکسی میکروفلور روده را تحت تأثیر قرار می دهد و شیوع اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس آیروس وگونه های کلستریدیوم را کاهش می دهد.

Micrococcus luteus با داشتن توان مبارزه با عفونت های *A.salmonicida* در قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* یافت شده است. همچنین استفاده از *Lactococcus lactis* تحریک رشد روتیفرها و مهار *V.anguillum* را سبب می شود.Joborn و همکارانش در سال 1997 تعیین کردند که *Carnobacterium inhbenski* جدا شده از مجرای معده ای – روده ای ماهی آتلانتیک *Salmo salar* مواد مهاری فعالی در مقابل پاتوژن های باکتریایی ماهی در آزمایشگاه تولید می کند.

باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک

باکتریهای تولیدکننده اسید لاکتیک جزء باکتریهای گرم مثبت، غیر متحرک و بدون قابلیت تولید اسپور هستند. تولید اسید لاکتیک در آنها محصول نهایی حاصل از تخمیر می‌باشد. این باکتریها دارای نیازهای تغذیه‌ای اختصاصی بوده و نیازمند به انواع کربوهیدراتها، اسیدهای امینه، پپتیدها ، مشتقات اسید نوکلنیک و ویتامین می‌باشند. گونه‌های مختلف باکتری‌های LAB برای رشد در محیط‌های مختلف سازگار گردیده و عمدتاً در دستگاه گوارش موجودات خونگرم، محصولات لبنی محصولات دریایی یافت می‌شود.

علِی رغم وجود اطلاعات ارزشمندی که در زمینه نقش و اهمیت این باکتری‌ها در موجودات خونگرم وجود دارد، تنها در مطالعات اندکی به حضور طبیعی این باکتریها در دستگاه گوارش و بویژه روده ماهیان اشاره گردیده‌است. مطالعه فاکتورهای تأثیرگذار بر جمعیت باکتریهای تولیدکننده اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش آبزیان از اهمیت بسیاری برخوردار است.

باکتری های گرم منفی

از انواع باکتری های گرم منفی که به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند:

Aeromonas hydrophilic, Aeromonas media, Pseudomonas sp, Pseudomonas flurescens, Photorhodobacterium sp, Alteromona Roseobacter sp, Vibrio anginolyticus , Vivrio fluvialis,... برای مهار A.salmomicida در پرورش ماهیان باله دار استفاده می شود .

برای مبارزه با *V.anguillarum* تحقیقات زیادی توسط Gram و همکارانش در سال 2001 صورت گرفته و 1018 گونه ی مخمری و باکتریایی از پوست، آبشش و روده قزل آلای رنگین کمان *Oncorhyncus mykiss* به دست آوردند. که 45 گونه جدا شده آن نسبت به *V.anguillarum* مهارکننده بودند. گونه اصلی مخالف ویبریوزیس پسودوموناس بود که موجب بقای قزل آلای رنگین کمان *Oncorhyncus mykiss* به دنبال افزودن آن درکشت آبی می شود. باکتری های دیگر پرورش لابستر، اویستر اقیانوس آرام و سپر ماهی را بهبود می بخشند. همچنین Langdon, Douillet در سال 1994 نشان دادند که *Alteromonas* بقای صدف *gigas Crassostrea* را در آب افزایش می دهد. پروبیوتیک محافظت کننده از ماهی قزل آلا وآزاد آتلانتیک به مقدار زیاد با *A.salmomicida* و در اندازه ای کمتر با *V.ordalii*, *V.anguillarum* مبارزه می کند.

جلبک های تک سلولی

یک جلبک تک سلولی که به طور هتروتروفی رشد می کند، *Tetraselmis suecica* بعنوان غذا برای Penaeids و افزودنی غذایی برای Salmonids مورد استفاده قرار گرفته است که کاهش در میزان بیماری های باکتریایی را آشکار می سازد 1-7-2-4- **مخمرها**

از مخمرهای پروبیوتیکی می توان به *Saccharmyces cervisiae* و *Debarymyces hansenii* اشاره کرد.

تحقیقات انجام شده

در ارتباط با استفاده از پروبیوتیک باکتریایی چند مطالعه در ایران انجام گرفته است نظیر

تولید پروبیوتیک باکتریایی به منظور تهیه نمودن استخرهای پرورش ماهیان گرمابی با تاکید بر کاهش آمونیاک و نیتریت . پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

استفاده از باکتریهای لاکتیک در رشد و بقاء ماهی سفید مرکز تحقیقات ماهیان استخوانی

و چند مطالعه در قالب پروژهای دانشجویی در ارتباط با استفاده از پروبیوتیک های تجاری نظیر Protexin و Aqualase به منظور رشد و بقاء ماهی قزل آلا انجام شده ولی در خارج مطالعات مختلفی در ارتباط با ماهی و میگو با استفاده از پروبیوتیکهای دیگر نظیر , Epicin Aquatron , Alken Murray انجام گرفته است .

مطالعات Gomez و همکارانش نشان داد که میکروفلور روده بر سیستم ایمنی ماهی تاثیرگذاشته و موجب تغییر در برخی از پارامترهای ایمنی هومورال نظیر پپتیدهای ضد میکروبی . لیزوزیم . کمپلمان، ترانسفرین. لکتین و آنتی باکتریها و ایمنی سلول مثل سلولهای سایتوتوکسی غیر اختصاصی و فاگوسیتها (ماکروفاژها و نوتروفیل ها) میشود. جذب پروبیوتیک در دستگاه گوارش باعث بهبود فلور روده شده که این عمل با مکانیسمهایی نظیر تولید متابولیتهای مختلف ، مهار بیان ژن ویرولانس در باکتریهای بیماریزا، افزایش پاسخ ایمنی و رقابت در کلونیزه شده در اپی تلیوم روده انجام میگیرد.

نتایج مطالعات Wache نشان داد که ساکارومیسس سرویزیه بعنوان پروبیوتیک باعث تکامل دستگاه گوارش ماهی بچه قزل آلا شده و در مقایسه با دباریومایسیس hansenii نتایج بهتری داشته است.

نتایج مطالعات Gatesoupe در ارتباط با کاربرد باکتریهای لاکتیک در مزارع پرورش ماهی نشان داد که اکثر باکتریهای لاکتیک جز باکتریهای مفید بوده و میتوانند بعنوان پروبیوتیک در آبزی پروری مورد استفاده قرار گیرند. این باکتریها با تولید متابولیتهای مختلف باعث تقویت سیستم ایمنی شده ولی کارآیی آنها در آب شور کمتر از آب شیرین بوده زیرا ماندگاری آنها در آب شور کمتر می باشد. برخی از باکتریهای گروه لاکتیک مثل استرپتوکوکوس inaei و لاکتوکوکوس garvieae جز باکتریهای بیماریزا می باشند .

نتایج مطالعات Abdel-Tawwab در ارتباط با مخمر ساکارومیسس سرویزیه و تاثیر آن بر رشد و سیستم ایمنی ماهی در ماهی تیلاپیا نشان داد که این مخمر با دوز 0/1 درصد باعث افزایش رشد و بقا شده و ماهی را در برابر آئروموناس هیدروفیلا مقاوم میسازد .

نتایج مطالعات Becerril و همکارانش در ارتباط با مخمر دباریومایسیس در ماهی Myeteroperea rosacea نشان داد که این مخمر باعث افزایش آنتی بادی IgM و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز شده و همچنین باعث افزایش مقاومت ماهی به دینوفلاژل Amyloodinium ocellatum میشود .

نتایج مطالعات Bagni و همکارانش در ارتباط اثرات کوتاه مدت و درازمدت بتا گلوکان مخمر و ارگوسان در پاسخ سیستم ایمنی ماهی Sea bass نشان داد که این ترکیبات باعث افزایش فعالیت کمپلمان . لیزوزیم و سایر پارامترهای خونی بهنگام استرس و ضعف سیستم ایمنی میگردند.

نتایج مطالعه Li و همکارانش در ارتباط با استفاده از مخمر ساکارومیسس سرویزیه در ماهی Hybrid striped bass نشان داد که این مخمر باعث تقویت رشد و بقاء و افزایش برخی از پارامترهای ایمونولوژیکی ماهی شده و مقاومت این ماهی را در برابر استرپتوکوکوس inaei افزایش داده و پیشنهاد کرد که این مخمر میتواند در دراز مدت بدون آنکه سیستم ایمنی ماهی را کاهش دهد ، مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج مطالعه Panigrahi و همکارانش در ارتباط با باکتریها بعنوان عوامل موثر بر پاسخ ایمنی در ماهی قزل‌آلا نشان داد که بهنگام استفاده از لاکتوباسیلوس rhamnosus ، برخی از پارامترهای ایمنی نظیر فعالیت فاگوسیتی ، کمپلمان ، ایمونوگلو بولین افزایش می یابد.

مشابه مطالعه Panigrahi توسط Nikoslcelainen انجام گرفت و نتایج مشابه مشاهده گردید .

نتایج مطالعه Chang و همکارانش در ارتباط با ارزیابی دو باکتری انتروکوکوس و باسیلوس به منظور کاهش ادواردسیلوز در مار ماهی اروپایی نشان داد که باکتریهای مورد استفاده باعث مهار ادواردسیلوز شده ولی کارآیی باسیلوس بهتر می باشد .

مطالعات Khattab و همکارانش در ارتباط با پروبیوتیک باکتریایی و تاثیر آن بر رشد و پارامترهای فیزیولوژی و هماتولوژی Oreochromis niloticus نشان داد که بهنگام استفاده از سودوموناس و میکروکوکوس لوتئوس ، برخی از پارامترها نظیر رشد و بقا، FCR . پروتئین و خاکستر بافت ماهی و شمارش اریتروسیتها افزایش داشته ولی میزان هماتوکریت ، .ALT.AST و LDH کاهش داشته است .

در آزمایشی که برروی *Japanese flounder* انجام گرفت مقدار تجویز پروبیوتیک به میزان 10 درصد وزن بدن ماهی بودکه موجب کاهش43 درصدی در میزان مرگ و میر تیمار دریافت کننده نسبت به گروه شاهد شد ، همچنین در آزمایشی دیگر که درمرکز تحقیقات انیستیتو Latvin برروی 3000 قطعه ماهی آزاد *Salmo salar* انجام شد و 15 روز به طول انجامید مرگ و میر در گروه A با غذای بدون پروبیوتیک 21درصد و درگروه B با تیمار دریافت کننده 0/5 گرم تپاکس در هر کیلو گرم غذا 15درصد و در گروه C با تیمار دریافت کننده 1گرم تپاکس در هر کیلو گرم غذا 20درصد بوده است که وجود تپاکس علت کاهش مرگ و میر و بهبود رشد ماهی بوده است. رژیم غذایی زنده با ساکارومایسس سرویزیه راندکان تغذیه را در کپوراسرائیلی افزایش داده امااین افزایش کمتر از زمان استفاده ازرژیم غذایی با*Streptococcus faecium* بوده است، درآزمایشی که در سال 2001 انجام پذیرفت نشان داده شد که ماهی قزل آلا *Oncorhynchus mykiss* در 24 ساعت بعد از تیمار با ساکارومایسس سرویزیه به طور نسبی افزایش وزن داشته همچنین تعادل در ادرار و مدفوع نیز در این آزمایش دیده شد (تقوی، 1384). طبق آزمایش صورت گرفته در سال 1999 در Beurup دانمارک بر روی قزل آلا *Oncorhynchus mykiss* و ماهی آزاد *Salmo salar* که حدود 2 ماه به طول انجامید میانگین وزن در گروه دریافت کننده تپاکس 15/16 درصد بهتر از گروه کنترل بود. Cho و همکاران در سال 2001 با بکارگیری از ناپلئوس آرتمیا غنی سازی شده با مخمر در تغذیه ماهی صخره ای کره ای متوجه شدند که این رژیم غذایی موجب افزایش بازماندگی لاروها و همچنین افزایش اسیدهای چرب درآنها شده است. مطالعات Li و همکاران (2004) برروی هیبرید باس مخطط که زا آمیزش دو گونه(*Morone Chrysops×Morone Saxatlis*) است حاکی از افزایش رشد، مقاومت در برابر استرس های مدیریتی و تقویت سیستم ایمنی در نتیجه استفاده از مخمر در رژیم غذایی این گونه می باشد. مطالعات انجام شده بوسیله Tovar وهمکاران (2004) برروی لاروهای باس دریایی *Dicenterachus Labrax* بیانگرتاثیر مثبت استفاده از مخمر*Debaryomyces hansenii* برروی تسریع تکامل دستگاه گوارش این گونه است به طوری که موجب افزایش معنی دار ترشح آنزیم آمیلاز شده است. در سال (2005) Lim و همکارانش مقاله ای را با مضمون افزایش رشد و بازماندگی لاروتیلاپیا با بکارگیری از ناپلئوسهای آرتمیای غنی شده باسلولهای مخمر *Saccharomyces cervisiae* منتشر کردند. بررسی های متعدد و متنوعی بر روی کاربرد پروبیوتیکها درخارج از کشور بر روی آبزیان درمراحل مختلف سنی صورت پذیرفته است که اکثراً به جدا سازی پروبیوتیکها بویژه گونه های مختلف باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک از دستگاه گوارش آبزیان اقدام گردیده است. مهمترین بررسی های صورت گرفته در سالهای 1997 تا 2007 عبارتند از:

Gilldberg و همکارانش در سال 1997 گزارش کردند استفاده از*Carnobactericcm divergens* برای تغذیه بچه ماهی کاد آتلانتیک *Gadus morbua* منجر به مقاومت این بچه ماهیان در برابر *Vibrio anguillarum* می شود. همچنین Gram در سال 1999 مشخص کرد که شستشوی قزل آلای رنگین کمان *Oncorhynchus mykiss* برای 6 روز در *P.fluorescens* مرگ و میر را از 47درصد به 32درصد کاهش می دهد. De schriver و همکارانش درسال 2000 گزارش دادند *V. proteolyticus* هضم پروتئین رادرسپرماهی جوان بهبود *(Scophthalmus maximums)* می بخشند. در بررسی انجام شده بوسیله Robertson و همکاران (2000) برروی آزاد ماهیان شامل دو گونه ماهی آزاد آتلانتیک *Salmo salar* و.قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)، باکتری *Carnobacterium. sp* از دستگاه گوارش این ماهی جدا، کشت داده شده و به جیره غذایی این دو گونه در مقادیر متفاوت افزوده شد. نتایج آن حاکی از افزایش رشد و بقای لاروهای این دو گونه و افزایش مقاومت آنها در برابرحضورباکتریهایی نظیر*Vibrio anguillarum, A.salmonicida , hydrophila* . *A* و غیره می شود.

Austin , Irianto (2002) گزارش دادند که کشت های *A.hyolrophila* و*V.fuvia* در کنترل عفونت ایجاد شده در قزل آلای رنگین کمان بواسطه *A.salmonicida*، موثر باشد Gomez –Gill وهمکارانش (2000) نشان دادند با توجه به اهمیت نقش جلیکCheatocerose درتغذیه میگوهای خانواده پناییده درمرحله پروتوزوآ، حضور پروبیوتیک باکتریایی با نام علمی *Vibrio anginolyticus* قادر به بهبود و افزایش رشد این جلیک خواهد بود. Nikoskelainenو همکاران (2003) اثرات سود بخش ناشی از کاربرد پروبیوتیک باکتریایی *Lactobacillus rhamnosu* دردوزهای متفاوت بصورت خوراکی برای ماهی قزل آلای رنگین کمان رادر تقویت سیستم ایمنی ورشد این گونه مشاهده نمودند. تحقیقات Meunpol و همکاران(2003) برروی میگوی *Penaeus monodon* نشان می دهد استفاده همزمان از دو پروبیوتیک باکتریایی شامل Bacillus , Vibrio در جیره غذایی به همراه وارد کردن ازن به آب منجر به افزایش رشد و بقاء دراین گونه می گردد. بررسی های Gulliana و همکاران (2004) برروی *Penaeus vannamei* نشان می دهدکه استفاده از پروبیوتیکهای باکتریایی شامل Bacillus, Vibrio در تغذیه آنها نه تنها منجر به افزایش رشد در آنها می گردد بلکه در تقویت سیستم ایمنی آنها نیز نقش عمده ای را دارا می باشد و این امر در مورد Bacillus بیشتر صادق است.

جداسازی و تولید نیمه صنعتی سویه‌های باسیلوس بالقوه پروبیوتیک برای طیور

پروانه جعفری[1]، قدرت الله محمد زمانی[2]، فرزانه الماسیان[2] و مریم تاج آبادی ابراهیمی[3]

[1]– دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، پژوهشکده مهندسی جهاد کشاورزی

[2]– پژوهشکده مهندسی جهاد کشاورزی

[3]– دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

تاریخچه

پروبیوتیک‌ها برای اولین بار توسط متچنیکوف[1] در سال 1907 بر اساس مشاهداتش بر روی یک دهقان بلغاری مطرح گردیدند. وی مشاهده کرد که این زوستائیان به واسطه مصرف مقادیر فراوان ماست تخمیری، سالم‌تر بوده و کمتر به بیماری دچار می‌شوند و این امر را وجود میکروارگانیزم‌های مفیدی در ماست نسبت داد که اثرات میکروب‌های مضر روده را از بین می‌برند. وی بیان نمود که این اثرات سودمند، به خاطر سکونت لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس در روده ایجاد می‌شود [1].

واژه پروبیوتیک دارای ریشه لاتین به معنی «برای زندگی[2]» است. این واژه اولین بار در سال 1965 توسط لی‌لی و استیل‌ول[3] به تشریح توضیح مواد ترشحی یک میکروارگانیزم مورد استفاده قرار گرفت که رشد میکروارگانیزم‌های دیگر را تحریک می‌نمود [2، 3]. از این واژه پروبیوتیک متضاد واژه آنتی‌بیوتیک بود. در سال 1989، فولر[4] تعریف فوق را به صورت زیر اصلاح نمود [4]:

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی از میکروب‌های زنده می‌باشند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی بر روی میزبان (انسان یا حیوان) اعمال می‌کنند. پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از مهم‌ترین دستاوردهای پیشرفت تکنولوژی دانست که از شرایط طبیعی میکروارگانیزم‌ها در دستگاه گوارش و تعادل موجود در طبیعت الهام گرفته شده است [5]. پروبیوتیک‌ها یک یا مخلوطی از چند میکروارگانیزم هستند که سبب تحریک رشد باکتری‌های مفید و کاهش بیماری‌زایی میکروب‌های مضر می‌شوند و معمولاً مکانیزم عمل آن‌ها متکی به جایگزینی و حیات آن‌ها است. پروبیوتیک‌ها نه تنها به عنوان محرک رشد بلکه برای تحریک دستگاه ایمنی و پیشگیری از ابتلاء به بسیاری از بیماری‌ها به کار گرفته می‌شوند [6].

مکانیسم **اثرپروبیوتیک‌ها**

مکانیزم اثر پروبیوتیک‌ها در بهبود کیفیت حیات میزبان و ممانعت از ابتلا به بیماری‌های عفونی به طور دقیق مشخص نشده است. به اثبات رسیده که میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک می‌توانند در سطوح متفاوت روده همانند سلول‌های اپی‌تلیال و یا در فرورفتگی‌های روده کلونیزه شوند. بدین ترتیب از استقرار باکتری‌های بیماری‌زا حتی به هنگام استرس هم ممانعت به عمل می‌آید. از سوی دیگر پروبیوتیک‌ها به واسطه توانائی تولید آنزیم، موجب تجزیه مواد غذائی می‌گردند. مکانیزم‌های احتمالی پروبیوتیک‌ها برای حفاظت میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا به شرح زیر می‌باشد:

– تولید ترکیبات مهارکننده همانند اسیدهای چرب زنجیره کوتاه همانند استات، لاکتات، پروپیونات، سوکسینات و بوتیرات، پراکسید

[1] Metchnikoff
[2] For life
[3] Lilly and Stillwell
[4] Fuller

هیدروژن و ترکیبات باکتریوسین4[1] [7]

- رقابت برای جایگاه های اتصال [8]

- رقابت برای کسب مواد غذایی [9]

- از بین بردن گیرنده‌های سم در سلول‌های روده [10]

- فعالیت ضد سرطانی [9، 11]

پروبیوتیک‌های دامی

روش‌های سنتی و متداول پرورش حیوانات و جیره‌های مصرفی ممکن است با تغییر ترکیب میکروفلور روده، مقاومت حیوانات به عفونت و آلودگی را کاهش داده و زندگی آن‌ها را به مخاطره اندازد. استفاده از مواد شیمیایی، خطرآلوده کردن لاشه حیوانات به این مواد و نیز وارد شدن ترکیبات شیمیایی مضر و زیان بار را به چرخه غذا به همراه خواهد داشت [4، 12، 13].

سازوکارهای پیشنهاد شده برای بهبود عملکرد پرورش حیوانات، تغذیه مستقیم میکروبی5[2] است. صنایع غذایی ایالات متحده آمریکا به همراه اتحادیه غذا و دارو و گروه کشاورزی ایالت متحده، واژه عمومی تغذیه مستقیم میکروب یا DFM را برای تشریح افزودنی‌های غذایی میکروبی تصویب کرده است [14، 15].

تغذیه مستقیم حیوانات با میکروارگانیزم‌ها عبارت است از خوراندن مقادیر زیادی از میکروب‌های مفید به حیواناتی که تحت تنش قرار دارند. در تئوری فوق هدف از تغذیه با میکروارگانیزم‌های مفید پیشگیری از استقرار میکروارگانیزم‌های مضر یا جایگزینی دوباره جمعیت میکروبی طبیعی دستگاه گوارش می‌باشد.

استفاده از پروبیوتیک‌ها علاوه بر توانایی جایگزین شدن ترکیبات شیمیایی محرک رشد در حیوانات مزرعه، اثرات زیر را نیز در پی خواهند داشت [16]:

- افزایش سرعت رشد

- بهبود ضریب تبدیل خوراک

- بهبود مقاومت در مقابل بیماری

پروبیوتیک طیور

جوجه‌ها پیش از تولد6[1] عاری از هرگونه باکتری می‌باشند. با شروع نوک زدن به پوسته و تولد جوجه، وضعیت باکتریایی روده سریعاً تغییر می‌نماید. جوجه‌هایی که در شرایط طبیعی به دنیا می‌آیند با مجموعه‌ای از ویروس‌ها، باکتری‌ها وقارچ‌های موجود در گله در تماس

[1] Bacteriocins
[2] Direct Fed Microbials (DFM)

می‌باشند. این ارگانیزم‌ها در عرض چند ساعت تکثیر یافته و فلور طبیعی روده را تشکیل می‌دهند که میکروفلور روده نامیده می‌شود. این میکروارگانیزم‌ها غالباً مفید بوده و خطری برای جوجه در بر ندارند. لایه مخاطی روده همراه با این‌میکروارگانیزم‌های مفید موجب تثبیت عملکرد دستگاه گوارش گشته و دستگاه گوارش جوجه را در مقابل هجوم باکتری‌های پاتوژن و مضر محافظت می نماید. با ایجاد این میکروفلور، رشد باکتری‌های مضر از قبیل سالمونلا و کلی‌باسیلوس7[۲] از چینه‌دان تا کلواک محدود می‌شود [15، 17، 18].

در پرورش مدرن طیور سعی می‌شود با دور نگهداشتن جوجه‌های از حیوانات بالغ، از گسترش بیماری‌ها پیشگیری به عمل آید. جوجه‌هایی که در چنین محیطی متولد شده و رشد می‌یابند در محیطی نسبتاً مصنوعی قرار داشته و به همان اندازه فلور روده‌اشان تغییر می‌کند. تحقیقات نشان می‌دهد که میکروارگانیزم‌های متعدد موجود دستگاه گوارش این جوجه‌ها متفاوت از میکروارگانیزم‌های موجود در گله در شرایط طبیعی است. این مسئله موجب می‌شود تا این جوجه‌های ایزوله شده نسبت به عفونت‌های روده‌ای خطرناک حساس‌تر باشند. در تلاش برای رفع این معضل تحقیقات زیادی بر روی فلور روده‌ای این جوجه‌ها صورت و به کارگیری پروبیوتیک صورت گرفته است [12، 19، 20].

مواد و روش‌ها

نمونه **برداری** و غنی سازی [21، 22]

هدف ما از این پروژه جداسازی باسیلوس پروبیوتیک به ویژه برای طیور بود از این رو نمونه برداری از فضولات مرغ صورت گرفت. برای نمونه برداری با استفاده از سوآپ استریل نمونه‌فضولات به بافر منتقل شده و در آزمایشگاه به نسبت 1:1 رقیق و با استفاده از ورتکس کاملاً مخلوط گردیدند. در ادامه از تیمار حرارتی برای غنی سازی باسیلوس‌ها استفاده شد. برای این منظور سوسپانسیون نمونه در دمای ºC 80 به مدت 15 دقیقه یا در دمای ºC 65 به مدت 20 تا 40 دقیقه حرارت داده شد.

جداسازی و **نگهداری** سویه‌ها

برای جداسازی ابتدا نمونه‌های تیمار شده نمونه‌ها به صورت سری رقیق و از هر رقت بر روی پلیت حاوی محیط نوترین آگار کشت داده شد. پس از گرماگذاری کلنی‌های تیپیک کاتالاز مثبت، گرم مثبت و میله‌ای شکل دارای اسپور جدا گردیدند. به منظور مقایسه دو سویه تجاری موجود در محصول پروبیوتیک بیوشم8[۳] جدا شده و دو سویه باکتریایی باسیلوس‌سوبتی‌لیس و باسیلوس‌لیکنی‌فورمیس9[۴] نیز از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی تهیه گردید.

---

[1] Hatch
[2] Colibacillus
3 Biochem
4 B.licheniformis

سویه‌های جدا شده به روش گرم رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی 1000 X مشاهده شدند و خصوصیات اولیه کلنی‌ها نیز تعیین گردید. برای نگهداری سویه‌ها از 3 روش پاساژهای متوالی، کشت بر روی سطح شیب‌دار و استفاده از گلیسرول بهره برده شد.

آزمایش‌های بیوشیمیایی به منظور شناسایی اولیه سویه‌ها

برای شناسایی باسیلوس‌ها و افتراق آن‌ها از یکدیگر از آزمایش‌های شیمیایی بهره برده شد. لازم به ذکر است که در تمامی آزمایش‌ها از کشت تازه مایع و 18 h ساعته سویه‌ها با غلظت 0/5 مک‌فارلند برای تلقیح بهره برده شد [23].

بررسی توانایی رشدی سویه‌ها

برای توانایی رشدی سویه‌های جدا شده، باکتری ها در ارلن‌های 300 ml حاوی 45 ml محیط کشت گلوکز کشت داده شدند. پس از اتمام دوره تخمیر، جذب نوری سویه‌ها در 620 nm تعیین شد.

تعیین سینتیک رشد

برای تعیین سینتیک رشد، سویه‌ها همانند قبل در ارلن کشت داده شدند. در فواصل زمانی معین هر 2 h نمونه برداری از ارلن‌ها صورت گرفت و جذب نوری اندازه گیری شد. بدین ترتیب الگوی رشدی سویه‌های جدا شده در زمان‌های مختلف تعیین گردید [24].

بهینه سازی در شیکر آزمایشگاهی

برای تعیین شرایط بهینه رشدی سویه‌های جدا شده ابتدا باید عوامل موثر بر رشد و میزان بهینه هر عامل تعیین گردد. غلظت گلوکز آغازین، غلظت و نوع منبع ازت و pH محیط کشت، مهم‌ترین عوامل موثر بر رشد بودند. از این رو سویه‌های منتخب در شرایط مختلف کشت داده شده و پس از اتمام دوره تخمیری جذب نوری آن‌ها همانند قبل سنجیده شد. بدین ترتیب شرایط مناسب رشدی برای هر سویه تعیین گشت.

بهینه سازی تولید اسپور

خشک کردن باسیلوس‌ها بر اساس روش خشک کن پاششی می‌باشد که در آن فرم اسپوردار باکتری زنده باقی مانده و باکتری‌های رویشی عموماً در طی فرایند حرارتی از بین می‌روند [25]. با توجه به این امر جداسازی سویه‌هایی با توانایی بالاتر تولید اسپور و بهینه سازی محیط کشت برای تحریک روند اسپورسازی اهمیت فراوان دارد. از این رو تاثیر یون‌های مختلف بر روند اسپورسازی بررسی گردید. بدین ترتیب سعی در طراحی محیط کشتی طراحی گردید که در آن اسپورسازی سویه‌ها حداکثر باشد.

تعیین حداکثر رشد ویژه سویه 75 در کشت بسته

برای تعیین حداکثر رشد ویژه، 9 ارلن 300 ml حاوی 45 ml محیط کشت تهیه و با پیش کشتی از سویه 75 تلقیح شد. بدین ترتیب 9 ارلن در شرایط یکسان بر روی شیکرانکوباتور گرماگذاری شدند. هر ساعت یکی از ارلن‌ها از روی شیکر برداشته شد و با استفاده از کیت گلوکز، میزان سوبسترای گلوکز موجود در محیط کشت تعیین شد. در مرحله بعد توده سلولی جدا و پس از 2 بار شستشو با آب مقطر در آون خشک و توزین گردید. بدین ترتیب حداکثر شد ویژه این سویه‌تعیین گردید.

ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌ها

از جمله مهمترین خصوصیات پروبیوتیکی باسیلوس‌ها می‌توان به مقاومت گرمایی، مقاومت به اسید، پپسین و صفرا (شرایط معده و رورده میزبان)، الگوی مناسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قدرت بازدارندگی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا اشاره نمود. در ادامه آزمایش‌های صورت گرفته بر روی سویه‌های بومی و باکتری‌های کنترل، برای ارزیابی و مقایسه خصوصیات پروبیوتیکی آورده شده است.

تعیین مقاومت سویه‌های جدا شده به نمک‌های صفراوی با روش DUC [26–28]

در این روش برای تعیین مقاومت سویه‌های جدا شده به صفرا ابتدا 10^8 تا 10^9 سلول در هر میلی‌لیتر از بافر ایزوتونیک10[1] سوسپانسیون گردید.به بافر فوق 0/2٪ نمک‌های صفراوی حاوی مقادیر مشابه 1:1 کولات سدیم11[2] و داکسی‌کولات سدیم12[3] افزوده و تلقیح آن با سوسپانسیون سلولی صورت گرفت. نمونه‌برداری در زمان 0، 1 و 3 h انجام و نمونه مجدداً در بافر به میزان مناسب رقیق شد. نمونه‌های رقیق شده پورپلیت شده و تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی13[4] آن‌ها تعیین گردید. برای تهیه نمونه شاهد، سلول‌ها در بافر بدون نمک صفراوی سوسپانسیون شده و همانند نمونه‌های قبل گرماگذاری و نمونه‌برداری شدند.

مقاومت سویه‌های جدا شده به اسید و پپسین با روش DUC [26–28]

1 Isotonic
2 Sodium cholate
3 Sodium deoxycholate
4 Colony Forming Unit (CFU)

برای تعیین مقاومت به اسید و پپسین ابتدا 10^8 تا 10^9 سلول در هر میلی‌لیتر از بافر ایزوتونیک14[1] با pH معادل 2 حاوی 1 mg/ml پپسین15[2] سوسپانسیون شد. نمونه‌ها در بر روی شیکرانکوباتور گرماگذاری و در زمان‌های 0، 0/5 و 1 h نمونه‌گیری شدند. نمونه‌ها در بافر سوسپانسیون شده و همانند قبل سری رقت از آن‌ها تهیه شد. با کشت بر روی محیط کشت تعداد باکتری‌های شمارش شد. در این مرحله نیز نمونه کنترل، سوسپانسیون سلولی گرماگذاری شده در بافر با pH خنثی و فاقد پپسین بود.

مقاومت به گرما [29]

این آزمایش به منظور ارزیابی میزان مقاومت باکتری‌ها به گرما صورت گرفت. محیط‌های کشت سویه مورد نظر بر روی شیکر انکوباتور گرماگذاری شدند. پس از گذشت 16h دو نمونه از محیط کشت تهیه و یکی از آن‌ها تیمار حرارتی شد. تعداد باکتری‌های موجود در دو نمونه تیمار شده و تیمار نشده با روش پورپلیت تعیین گردید. نسبت سلولی در این دو نمونه بیانگر میزان مقاومت دمایی بود.

بررسی مقاومت به نمک کلریدسدیم [30]

برای بررسی مقاومت به نمک سویه‌ها در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف کلریدسدیم (از 2 تا 25٪) کشت و بر روی شیکرانکوباتور گرماگذاری شدند. پس از 16 h جذب نوری نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید.

بررسی الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها [31]

برای تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ابتدا کشت تازه از سویه‌ها با غلظت معادل 0/5 مک فارلند تهیه شد. 0/1 ml از کشت باکتری‌ها بر روی سطح پلیت با قطر ثابت ریخته و پخش شد. دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک تتراسیایکلین، پنی‌سیلین، لینکومایسین و نئومایسین بر روی پلیت قرار گرفت و پلیت‌ها در دمای مناسب گرماگذاری شدند. ایجاد هاله در اطراف دیسک‌ها نشان دهنده حساسیت باکتری به آنتی‌بیوتیک کاربردی بود. در این آزمایش دو آنتی‌بیوتیک تایلوزین و سولتریم کاربردی در مرغداری‌ها نیز بدین ترتیب مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی خواص ضد باکتریایی سویه‌های جدا شده

رر این بخش از 3 روش سنجش فعالیت ضد میکروبی با روش Pugsley، روش انتشار در چاهک و روش انتشار دیسک بهره برده شد. بدین ترتیب سویه‌های نتخاب شدند که توانایی ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زا را با روش‌های نام‌برده داشتند [32-36].

1 Isotonic
2 Pepsine

تعیین Arbitrary unit (AU) برای باکتریوسین [37]

طبق تعریف هر AU، عکس حداکثر رقتی در هر میلی‌لیتر از باکتریوسین تعریف می‌شود که هاله ممانعت از رشد را نشان می‌دهد. برای تعیین AU ابتدا سوپرناتان مایع حاوی باکتریوسین (ACFS) تهیه شد. سوپرناتان تهیه شده به صورت سری به نسبت ½ رقیق شد.μ 5 از عصاره رقیق شده بر روی پلیت حاوی میکروارگانیسم محک لکه گذاری گردید. پس از گرماگذاری توانایی ایجاد هاله ممانعت از رشد مورد بررسی قرار گرفت. کم‌ترین رقتی که هاله‌ای حداقل به قطر 5 mm ایجاد کرده بود انتخاب شد. عکس رقتی که دارای این هاله بود به عنوان Au در واحد میلی‌لیتر گزارش شد.

تعیین خصوصیات ترکیب ضد میکروبی تولیدی به تیمارهای مختلف [38، 39]

در این آزمایش فعالیت باکتریوسین تولیدی در دامنه‌ای از pH، دما، تیمار حلال آلی و تیمار آنزیمی تعیین گردید. برای این منظور pH مایع ACFS به ترتیب در 5، 6، 7، 8 و 9 تنظیم و به مدت 2 h در 37 °C گرماگذاری و سپس فعالیت ضد میکروبی آن تعیین گردید. با مقایسه قطر هاله‌های ایجاد شده از نمونه‌های تیمار شده با کنترل، تاثیر pH بر فعالیت باکتریوسین تعیین گردید.

در ادامه ACFS به مدت 30 دقیقه در دمای 20، 25، 30، 35، 37، 40، 45، 50، 55، و 60 °C تیمار و فعالیت ضد میکروبی آن در مقایسه با نمونه تیمار نشده سنجیده شد.

در آزمایشی دیگر 10٪ از حلال‌های از حلال‌های متانول، استون، تولوئن و کلروفرم به ACFS افزوده و به مدت 1 h گرماگذاری شد. همانند قبل فعالیت ضد میکروبی عصاره تیمار شده نسبت به نمونه تیمار نشده تعیین گردید. به منظور بررسی مقاومت ACFS به آنزیم‌های مختلف ابتدا محلول پروتیناز K، آلفا کیموتریپسین، پاپائین، پپسین، تریپسین، الفا- آمیلاز و لیپاز در pH بهینه تهیه گردید. 10٪ از آنزیم‌های نامبرده با غلظت 1 mg/ml به ACFS افزوده و به مدت 2 h گرماگذاری شد. به منظور توقف عملکرد آنزیم مخلوط فوق به مدت 5 دقیقه در دمای 100 °C تیمار گردید. همانند قبل میزان فعالیت ACFS تیمار شده با آنزیم نسبت به نمونه تیمار نشده سنجیده شد.

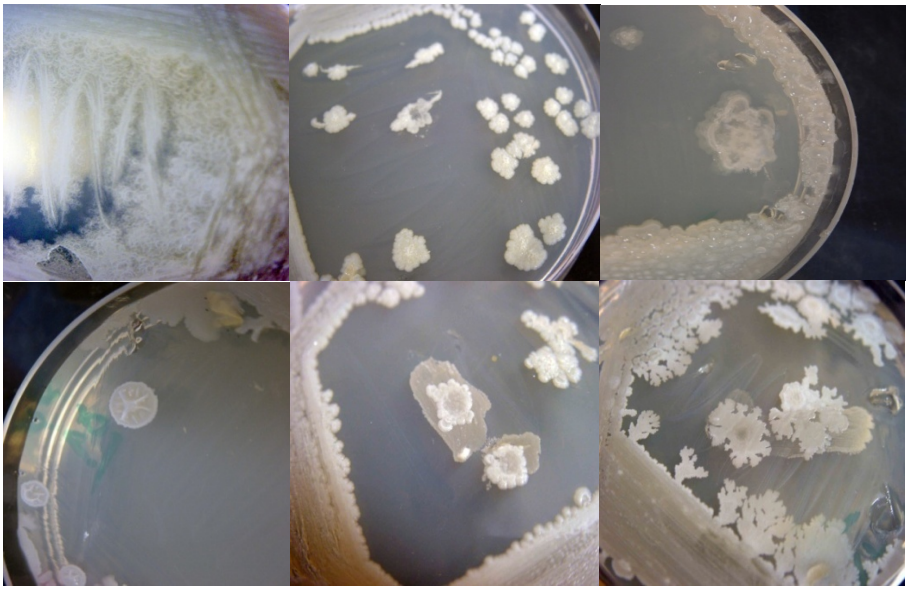
بهینه سازی در فرمانتور

برای بهینه سازی میزان رشد و تولید از طراحی آزمایش بر اساس روش تاگوچی (آرایه متعامد L9) بهره گرفته شد. بدین ترتیب 4 عامل دور همزن، هوادهی، غلظت آغازین منبع ازت و کربن در 3 سطح بهینه گردید. هر 9 آزمایش 3 بار تکرار شد و در طی آزمایش در فواصل زمانی معین نمونه‌گیری از فرمانتور انجام و جذب نوری نمونه تعیین گشت.

نتایج : سویه‌های باکتریایی

در این تحقیق بالغ بر 60 نمونه از 3 مرغداری تهیه و 220 سویه از آن‌ها جداشد. 205 سویه جدا شده گرم مثبت و مابقی گرم متغیر بودند. سویه‌های جدا شده تمامی باسیل‌های با 0/4 تا 2 µm قطر و طولی معادل 3 تا 12 µm با اشکال متفاوت بسیار بلند و کشیده و

بعضی به فرم کوکوباسیل با آرایش بسیار متنوع تکی، دوتایی، زنجیری و استرپتوباسیل بودند. سویه‌ها همگی اسپوردار بودند که اسپورها بخش‌های مختلف سلول (وسط، انتها و یا نزدیک به انتها) قرار داشت و در بعضی اسپورانژیوم به واسطه تولید اسپور متورم شده بود. شکل ظاهری کلنی سویه‌ها بسیار متفاوت بود که در زیر به عنوان نمونه تعدادی از کلنی‌های نمایش داده شده است.



شکل ظاهری کلنی سویه جدا شده

شناسایی شیمیایی سویه‌ها

آزمایش‌ها نشان داد که تمامی سویه‌ها باکتری‌های گرم مثبت، حساس به ونکومایسین، کاتالاز مثبت می‌باشند. در طی آزمایش همولیز 10 سویه به واسطه تولید همولیزین و احتمال بیمازی‌زایی حذف شدند. نتیجه کلی حاصله از این شناسایی شیمیایی نشان داد که سویه جدا شده از جنس باسیلوس می‌باشد ولی با توجه به پیچیدگی بسیار زیاد و نتایج متنوع حاصله امکان شناسایی سویه جدا شده تا حد گونه وجود نداشت. از این رو تصمیم گرفته شد تا شناسایی سویه مورد نظر با استفاده از روش ملکولی و تکثیر قطعه ژنومی 16 sRNA صورت گیرد.

بررسی توانایی رشدی

با غربال سازی اولیه 51 سویه انتخاب شد که توانایی رشدی بالاتری داشتند. این سویه‌ها رشد بیشتر و مناسب‌تری نسبت به باقی سویه‌ها داشتند از این رو بهینه سازی شرایط رشدی برای این سویه‌ها صورت گرفت

بهینه سازی شرایط رشدی

تحت شرایط بهینه در آزمایشگاه حداکثر بیومس خشک حاصله از رشد همزمان سویه‌های تجاری برابر g/l 5 بود در حالی که دو سویه PTCC حداکثر g/l 2–3 بیومس خشک باکتریایی تولید می‌نمودند. بالغ بر 60٪ ایزوله‌های جدا شده وزن خشکی بیش از محصول تجاری داشتند. این امر نشان‌گر توانایی رشدی بسیار بالای سویه‌های جدا شده بود. به عنوان مثال سویه 75 پس از اتمام بهینه سازی آزمایشگاهی وزن خشکی معادل g/l 6/32 تولید نمود.

بهینه سازی **تولید اسپور**

در تولید پروبیوتیک بر پایه باسیلوس‌ها، توانایی اسپورسازی حائز اهمیت فراوان است. نتایج نشان داد که باکتری‌های محصول تجاری دارای 90٪ و سویه‌های تهیه شده از بانک میکروبی در حدود 57٪ توانایی تولید اسپور در نتیجه توانایی مقاومت حرارتی دارند. ایزوله‌های بومی توانایی بالایی در تولیدی اسپور و توانایی مقاومت حرارتی نشان می‌دادند به گونه‌ای بیش از 80٪ ایزوله‌های منتخب دارای مقاومت حرارتی بالای 90٪ بودند. حتی در بعضی موارد مقاومت حرارتی باکتری‌های بومی جدا شده برابر 100٪ بود که در خور توجه می‌باشد.

تعیین حداکثر رشد ویژه سویه 75 در کشت بسته

در جدول زیر میزان وزن خشک زیست توده حاصله در زمان‌های مختلف، سوبسترای گلوکز باقی مانده و در نهایت میزان مقادیر مورد نیاز برای تعیین حداکثر رشد ویژه آورده شده است.

میزان بیومس، سوبسترا و رشد ویژه در طول دوره تخمیری

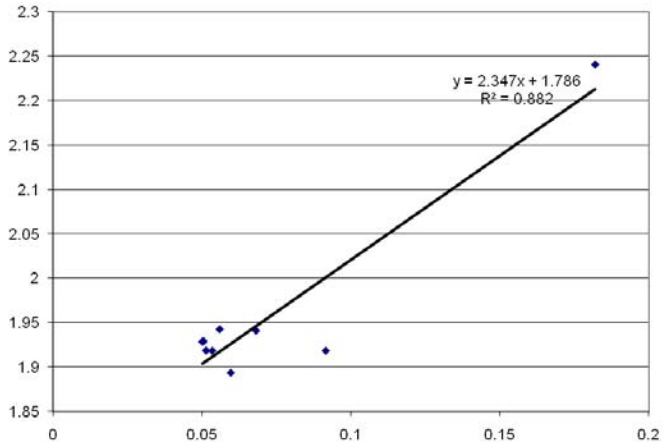
Time(h)	X(g/l)	S(gl-1)	μ	mean(S)	1/mean(S)	1/μ
0	0.044	20	0.518523194	19.945	0.050138	1.928554
1	0.0739	19.89	0.518374864	19.77	0.050582	1.929106
2	0.1241	19.65	0.52124656	19.445	0.051427	1.918478
3	0.209	19.24	0.521296924	18.69	0.053505	1.918293
4	0.352	18.14	0.514795008	17.865	0.055975	1.942521
5	0.589	17.59	0.528128375	16.745	0.059719	1.893479
6	0.9988	15.9	0.515221235	14.66	0.068213	1.940914
7	1.672	13.42	0.521296924	10.92	0.091575	1.918293
8	2.816	8.42	0.446287103	5.495	0.181984	2.24071
9	4.4	2.57				

هر کدام از پارامترهای فوق به صورت زیر تعیین می‌شود:

$$\mu = \ln \frac{N}{N_0}$$

$$meanS = \frac{S + S_0}{2}$$

در مرحله بعد منحنی $\frac{1}{\mu}$ بر حسب $\frac{1}{meanS}$ ترسیم شد که در زیر آورده شده است.



نمودار $\frac{1}{\mu}$ بر حسب $\frac{1}{meanS}$ حاصله از رشد سویه 75

معادله خط فوق را با استفاده از نرم Exdell بدست آورده و بر اساس آن می‌توان مقدار Ks و µmax محاسبه نمود.

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}}$$

Y= 2.347X+1.786

با مقایسه دو معادله فوق می‌توان نتیجه گرفت که:

$$\frac{K_s}{\mu_{\max}} = 2.347$$ **and**

$$\frac{1}{\mu_{\max}} = 1.786 \Rightarrow \mu_{\max} = 0.56$$ **and**

$$K_s = 2.347 \times 0.56 \Rightarrow K_s = 1.314$$

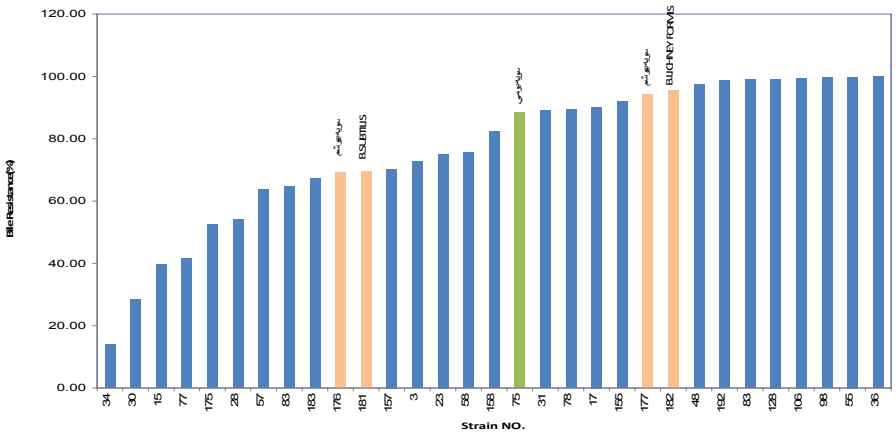
مقاومت به نمک و pH اسیدی

سویه‌پروبیوتیک مناسب باید نمک و اسید معده را تحمل کرده و در روده مستقر شود. باکتری‌های بومی جدا شده تمامی دارای توانایی رشد در pH اسیدی برابر 2 بودند که این خود یک مزیت به حساب می‌آید. کشت ایزوله‌های منتخب در pH های اسیدی تر نشان داد که بالغ بر 90٪ آن‌ها توانایی رشدی در pH برابر 1 را دارا هستند در صورتی که سویه‌های کنترل رشد بسیار ضعیفی در این شرایط اسیدی نشان می‌دادند. بررسی توانایی رشدی سویه‌ها در غلظت‌های فزاینده نمک نشان داد که ایزوله‌های جدا تمامی در 18٪ نمک رشد داشتند.

در مقادیر بالاتر نمک از تعداد ایزوله‌ها با توانایی رشدی کاسته شد. لازم به ذکر است یک پروبیوتیک مناسب باید توان تحمل 10٪ نمک و pH اسیدی معده را داشته باشد. تمامی باکتری‌های منتخب نه تنها غلظت‌های نمک بالاتر از میزان موجود در بدن حیوان را تحمل کرده بلکه قدرت رشد در غلظت‌های نمک بالاتر از 20٪ را نیز داشتند که این خود یک مزیت به حساب می‌آید.

مقاومت به نمک‌های صفراوی

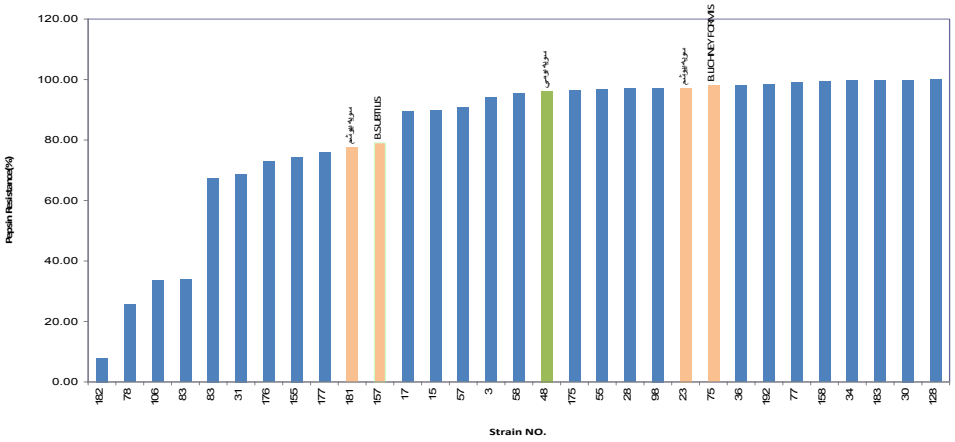
نتایج حاصله نشان داد که سویه‌های بیوشم دارای 70٪ مقاومت به نمک‌های صفراوی بوده و در مورد سویه‌های تهیه شده از PTCC این مقدار به 40٪ کاهش یافت. ایزوله‌های بومی نیز مقاومت بالایی به نمک‌های صفراوی نشان می‌دادند به گونه‌ای که در 60٪ موارد ایزوله‌های بومی مقاومتی بالای 70٪ داشتند. در زیر تعدادی از این ایزوله‌ها و میزان مقاومت آن‌ها نمایش داده شده است.



نمودار مقاومت به نمک های صفراوی

مقاومت به پپسین و اسید

نتایج نشان داد که تمامی ایزوله‌های مورد آزمایش و دو سویه بیوشم دارای مقاومت بسیار بالایی (بیش از 95٪) بوده و می‌توانستند به راحتی شرایط اسیدی و پپسین موجود در معده را به راحتی تحمل نمایند بدون آن که کاهش چشمگیری در رشد آن‌ها ایجاد شود. لازم به ذکر است که دو سویه تهیه شده از بانک میکروبی این توانایی را نداشته و در مجاورت با این شرایط رشد آن‌ها به کمتر از نصف کاهش یافت. در زیر تعدادی از این ایزوله‌ها و میزان مقاومت آن‌ها نمایش داده شده است.



نمودار مقاومت به پپسین و اسید

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

در این مرحله 3 آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، لینکومایسیین و تتراسایکلین مورد بررسی قرار گرفت. مشاهدات نشان داد که بیشتر سویه‌های جدا شده به جز تعدادی اندک به پنی‌سیلین مقاوم بودند. در مورد دو آنتی‌بیوتیک سولتریم و تایلوزین در بیشتر موارد سویه‌ها حساس بوده و رشد آن‌ها متوقف می‌شد.

ممانعت از رشد سویه های بیماری‌زا

یک سویه پروبیوتیک مناسب در صورت ممانعت از رشد سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا می‌تواند در ارتقاء سطح سلامت میزبان مصرف کننده بسیار مفید باشد. نتایج حاصله از این آزمایش بسیار جالب توجه بود. در این آزمایش باکتری‌های بیماری‌زا به خصوص عوامل بیماری‌زا در طیور به عنوان محک مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری‌ها عبارت بودند از:

- Staphilicoccus aureus (ATCC 64542)
- Salmonell sp. (Isolated from poultry farm)
- E.coli (ATCC 2143)
- *Yersinia entrocolitica* (ATCC 25673)
- *Listeria monocytogenes* (ATCC 345)
- Pseudoman (Isolated from poultry farm)

نتایج نشان داد که هیچ کدام از سویه‌های کنترل (سویه‌های بیوشم و PTCC) توانایی ممانعت از رشد هیچ کدام از باکتری‌های ذکر شده را نداشتند. ایزوله‌های بومی در بعضی موارد به نحوی بسیار موثر از رشد سویه‌های بیماری‌زا ممانعت می‌نمودند. در زیر این ایزوله‌های آورده شده است. در شکل زیر هاله ممانعت از رشد ایجادی علیه اشرشیاکلی توسط سویه 75 نمایش داده شده است.

نتایج تست مقاومت به محک

Indicator	Strain
Staphaphilococcus	75, 3, 204
Salmonella sp.	75, 83
E.coli	75, 23, 28, 30, 48, 55, 58, 155, 213
Yersinia entrocolitica	75, 15, 17
Lysteria monocytogenes	75
Pseudomonas sp.	23, 34, 48, 77, 78, 36, 155, 192

همان طور که در بالا نیز دیده می‌شود ایزوله شماره 75 به جز سودوموناس توانایی بسیار بالایی در ممانعت از رشد سویه‌های بیماری‌زا دارد. این امر می‌تواند بسیار مورد توجه باشد زیرا این سویه علاوه بر این قدرت ممانعت کنندگی خصوصیات بارز دیگری از جمله مقاومت بالا اسید و نمک صفراوی نیز دارد. از سوی دیگر زیست توده تولیدی با این سویه نیز بسیار بالا می‌باشد. به نظر می‌رسد با تکمیل آزمایش‌ها و اطمینان از ایمنی این سویه می‌توان از آن برای تولید پروبیوتیکی مناسب با توانایی چشمگیر بهره برد.

تعیین AU و خصوصیات ACFS

فعالیت ویژه باکتریوسین تولیدی این آنزیم علیه اشرشیاکلی در حالت بهینه برابر 12800 Au/ml بود. این باکتریوسین در pH برابر 7 بالاترین فعالیت را داشته و با انحراف از این PH فعالیت آن کاهش یافته به نحوی که در pH برابر 5 و 9 تنها 50٪ از فعالیـت خود را حفظ می‌نماید. باکتریوسین تولیدی حداکثر فعالیت را در دمای 37 °C داشته و با انحراف از مقدار بهینه دما و با تغییر 2 تا 3 درجه‌ای دما، فعالیت باکتریوسین به میزان 50٪ کاهش می‌یابد. با کاهش و افزایش دما به 20 و 60 °C تنها 25٪ از فعالیت آن باقی می‌ماند. تیمار آنزیمی باکتریوسین تولیدی این سویه نشان داد که این ماده ضد میکروبی به طور کامل به پروتئیناز K و آلفا–کموتریپسین حساس است. حساسیت به این آنزیم‌ها نشان دهنده ماهیت پروتئینی ترکیب ضد باکتریایی تولیدی بود. باکتریوسین تولیدی این سویه به طور کامل به دیگر آنزیم‌های به کار رفته (تریپسین، پپسین، پاپائین، آلفا آمیلاز و لیپاز) مقاوم بود. باکتریوسین تولیدی این سویه به حلال‌هایی همانند تولوئن، استن و کلروفورم حساس بوده و در طی تیمار با این حلال‌ها نیمی از فعالیت خود را از دست می‌داد ولی به طور کامل به متانول مقاوم است.

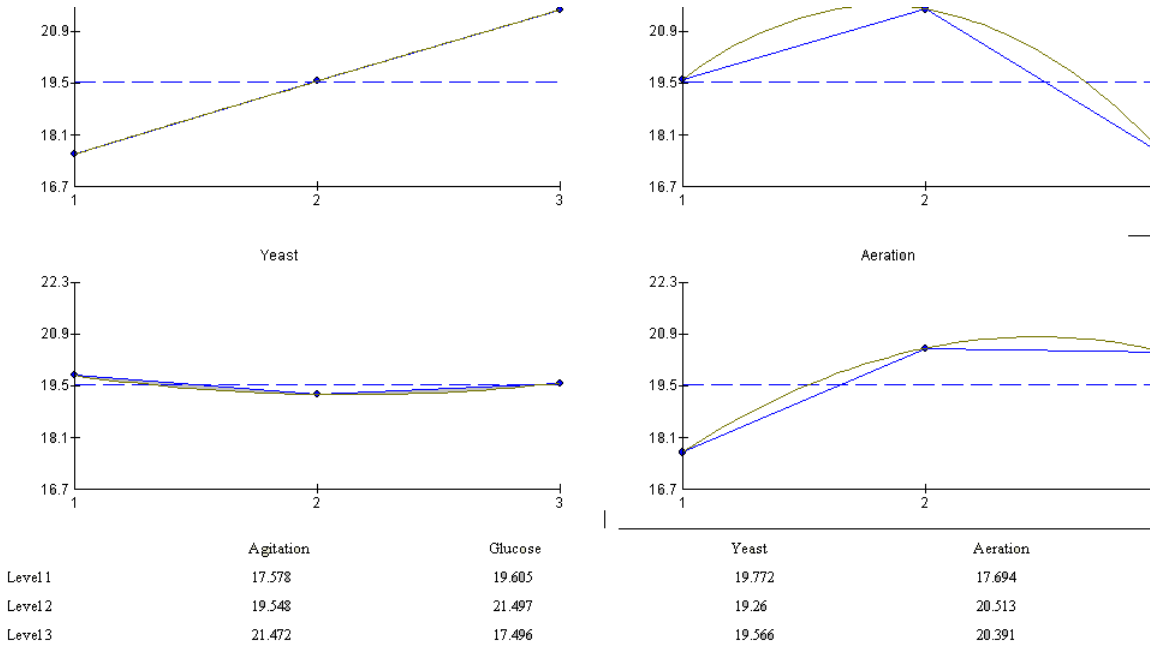
بهینه سازی سویه 75 با روش تاگوچی

در این قسمت نتایج حاصله از بهینه سازی سویه 75 با روش تاگوچی آورده شده است. در زیر نتایج حاصله از آزمایش تاگوچی آورده شده است.

میانگین بین نتایج حاصله در 9 آزمایش

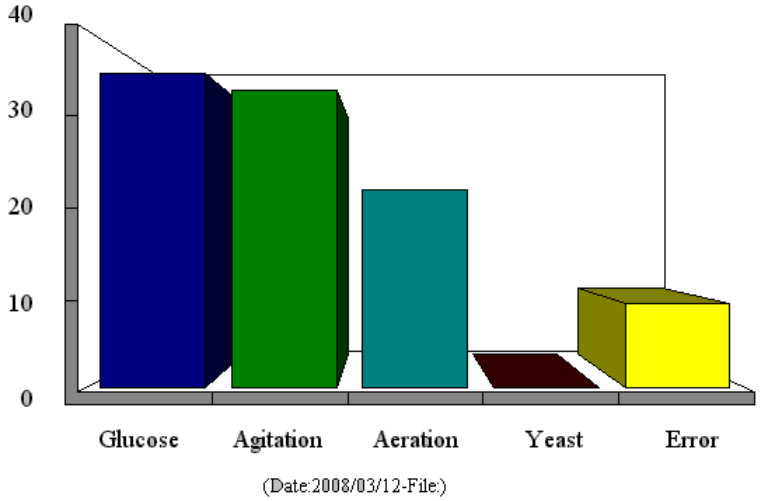
	Sample# 1	Sample# 2	Sample# 3	Sample# 4	Sample# 5	Sample# 6	Averages
Trial# 1	15.563	15.72	16.872				16.051
Trial# 2	19.985	20.024	20.743				20.25
Trial# 3	15.432	16.473	17.395				16.433
Trial# 4	18.436	19.775	22.41				20.206
Trial# 5	19.563	20.02	19.539				19.707
Trial# 6	18.72	18.63	18.843				18.731
Trial# 7	22.468	23.197	22.01				22.558
Trial# 8	23.982	24.64	24.981				24.534
Trial# 9	17.161	17.843	16.97				17.324
							19.533

در ادامه عوامل اصلی حاصله از تفسیر نتایج این آزمایش با نرم افزار Qualitek-4 آورده شده است. نمودارهای زیر نمایش دهنده شدت تاثیر و میانکنش عوامل موثر در تولید پروبیوتیک توسط سویه 75 در فرمانتور lit 1 آورده شده است.



	Agitation	Glucose	Yeast	Aeration
Level 1	17.578	19.605	19.772	17.694
Level 2	19.548	21.497	19.26	20.513
Level 3	21.472	17.496	19.566	20.391

شاخص‌شدت میانکنش بین عوامل موثر در تولید پروبیوتیک توسط سویه 75



نمودار میله‌ای عوامل موثر بر تولید پروبیوتیک توسط سویه 75 و میزان خطا

همان طور که در بالا دیده می‌شود غلظت آغازین گلوکز مهم‌ترین عامل موثر در تولید پروبیوتیک فوق می‌باشد. دور همزن و هوادهی به ترتیب عوامل موثر بعدی را تشکیل می‌دهند. عصاره مخمر در غلظت کاربردی تاثیری بر میزان رشد نداشته نمی‌تواند به عنوان عامل موثر در نظر گرفته شود. البته لازم به ذکر است که استفاده از عصاره مخمر در مقیاس با سایر منابع ازت می‌تواند سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در بیومس تولیدی در باسیلوس‌ها شود. به نحوی که میزان بازدهی با این منبع ازت در مقایسه با سایر منابه بیش از 10 برابر افزایش را در آزمایشگاه و در ارلن آزمایشگاهی نشان می‌داد. در ادامه شرایط بهینه پیشنهادی و میزان بیومس قابل انتظار آورده شده است.

شرایط بهینه برای تولید پروبیوتیک توسط سویه بیوشم و OD مورد انتظار

Column # / Factor	Level Description	Level	Contribution
1 Agitation	800	3	1.939
2 Glucose	25	2	1.964
3 Yeast	10	1	.239
4 Aeration	2	2	.98

Total Contribution From All Factors...	5.122
Current Grand Average Of Performance...	19.533
Expected Result At Optimum Condition...	24.655

در آزمایش تاییدی فرمانتور با شرایط نامبرده در بالا راه‌اندازی و در فواصل زمانی معین از نمونه گیری شد. بدین ترتیب سینتیک رشد باکتری در شرایط بالا تعیین گردید. پس از اتمام دوره تخمیری حداکثر جذب نوری حاصله برابر 30 بود و میزان بیومس خشک در این شرایط بالغ بر 20 g/l وزن خشک باکتریایی بود.

بحث و نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده همانند باکتری، قارچ و یا مخمر می‌باشند که می‌توانند کیفیت حیات میزبان را بهبود بخشند. این باکتری‌ها می‌توانند از سدهای دفاعی بدن همانند معده و روده عبور کرده و سپس در روده کوچک و حتی سطح بدن موجود جایگزین شوند. با استفاده از این محصولات، سیستم ایمنی میزبان تقویت شده مقاومت آن در برابر بسیاری از بیماری‌ها افزایش می‌یابد. امروزه صنعت پروبیوتیک در دنیا با سرعت بالا رو به گسترش است و محصولات تجاری مختلف با استفاده از میکروارگانیزم‌های گوناگون تولید و به بازار عرضه می‌شود. در کشورهای پیشرفته تولید این محصولات با کاربرد انسانی و دامی بسیار گسترده و درآمدزا می‌باشد.

استفاده از پروبیوتیک در صنایع پرورش طور نیز به طور روزافزونی رو به گسترش است. با استفاده از این محصولات در جیره غذایی طیور، میزان بازدهی تولید افزایش یافته، خطر ابتلای حیوان به باکتری‌های بیماری‌زا کاسته شده و اثرات جالب توجهی بر کاهش میزان کلسترول حیوان نیز اعمال می‌شود.

در ایران نیز به تازگی استفاده از پروبیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفته و محصولات تجاری از این دست به فروش می‌رسند. استفاده از این محصولات می‌تواند در بهبود ضریب تبدیل جیره غذایی به گوشت موثر باشد ولی باید توجه داشت که تولید محصولات پروبیوتیک در داخل کشور علاوه بر ممانعت از خروج ارز، می‌تواند به لحاظ علمی نیز بسیار مورد توجه باشد. از سوی دیگر باکتری‌های بومی ایران در طول زمان با سیستم گوارش حیوانات بومی سازش یافته‌اند و مسلماً می‌توانند اثرات بهتری را بهبود کیفیت حیات آن‌ها نشان دهند.

با توجه به توانمندی‌های موجود در بخش بیوتکنولوژی پژوهشکده مهندسی جهاد کشاورزی و با در نظر گرفتن پایلوت تولیدی در این پژوهشکده تصمیم گرفته شد تا اقدامات اولیه برای تولید محصولات پروبیوتیک کاربردی در صنعت پرورش طیور برداشته شود. از این رو بالغ بر 220 سویه باسیلوس بومی از مرغداری‌ها جدا و خصوصیات رشدی و پروبیوتیکی آن‌ها با سویه‌های جدا شده از محصولات تجاری مقایسه شد. در این بخش نتایج بسیار جالب توجهی حاصل شد به گونه‌ای که در پایان این آزمایش‌ها بالغ بر 30 باکتری مختلف تعیین گردید که خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها بسیار بهتر از سویه‌های محصول تجاری بوده و از سوی دیگر رشد بالایی نیز داشتند.

از مهمترین‌مشخصه بعضی از سویه‌های بومی، توانایی مقابله آن‌ها با باکتری‌های بیماری‌زا بود. محصولات تجاری مورد بررسی قرار گرفته به هیچ وجه توانایی ممانعت از رشد باکتری‌های بیماری‌زای متداول را نداشتند در حالی‌که تعدادی از باکتری‌های بومی به راحتی با توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی از رشد آن‌ها ممانعت می‌کردند.

فعالیت ضدمیکروبی باسیلوس‌ها علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را وجود ترکیبات مختلف (اسیدهای چرب و پراکسید و غیره) نسبت می‌دهند. درمیان این ترکیبات ضدباکتریایی باکتریوسین‌ها، پلی‌پپتیدهای ضدباکتریایی با مکانیسم عملکردی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. باکتریوسین‌ها اغلب دربرابر گونه‌هایی مرتبط با ارگانیسم‌های تولیدکننده دارند ولی باکتریوسین‌های باکتری‌های گرم مثبت همانند

باسیلوس‌ها، طیف اثر گسترده‌تری دارند. از این رو باکتریوسین سویه‌های جدا شده می‌تواند کاربرد گسترده‌تری به عنوان نگهدارنده نیز داشته باشد.

در مرغداری‌های انتخابی برای نمونه‌گیری از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی استفاده نمی‌شد از این رو سویه‌های جدا شده در معرض آنتی‌بیوتیک و فشار انتخابی ناشی از آن قرار نداشتند بنابراین در اکثر موارد سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد استفاده حساس بودند. این امر در مورد سویه‌های کنترل تهیه شده از PTCC هم مشاهده می‌شد. اما یکی از سویه‌های محصول تجاری بیوشم به جز نئومایسین به 3 آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، تتراسایکلین و لینکومایسین مقاوم بود. وجود ین مقاومت به آنتی‌بیوتیک همواره خطر انتشار مقاومت در بین سویه‌های بیماری‌زا را در پی دارد.

در بین باکتری‌های بومی جدا شده سویه 75 دارای خصوصیات بسیار جالب توجهی بود که نشان از دستیابی به سویه‌ای با خصوصیات پروبیوتیکی جالب توجه داشت که در زیر به آن‌ها اشاره می‌گردد.

سویه 75

یکی از بهترین سویه‌های جدا شده در طی این تحقیق سویه 75 بود. این سویه دارای خصوصیات جالب توجه به لحاظ رشد و فعالیت پروبیوتیکی بود که به اختصار به آن‌ها اشاره می‌گردد:

– این سویه گرم مثبت، توانایی تخمیر آرابینوز، گزیلوز، نشاسته و گلوکز را با کارایی بسیار بالایی داشت که این امر می‌تواند سبب بهبود کارایی تغذیه حیوان در رژیم غذایی مبتنی بر این سوبستراها شود.

– میزان بیومس تولیدی این سویه در ارلن آزمایشگاهی در شرایط بهینه برابر 6/25 g/l و بیومس تولیدی توسط دو سویه بیوشم به ترتیب برابر 4/3 و 6/32 g/l بود. این امر نشان دهنده توانایی رشدی بسیار مناسب سویه 75 در حد سویه‌های تجاری بود. حداکثر رشد ویژه (µmax)سویه 75 برابر 0/56 بود که نشان دهنده توانایی رشدی بالای این سویه است. این سویه پس از بهینه سازی میزان بیومس خشکی معادل 20 g/l تولید نمود.

– در محیط تکمیل شده با منگنز توانایی اسپورسازی این باکتری به 100٪ افزایش یافت. دو سویه بیوشم توانایی اسپورسازی برابر با 97/3 و 21/94٪ داشتند. همان طور که در قبل ذکر شود توانایی اسپورسازی برای پروبیوتیک‌هایی بر پایه باسیلوس‌ها اهمیت فراوان دارد. زیرا خشک کردن این محصولات با استفاده از اسپری‌درایر صورت می‌گیرد و فرم اسپوردار باکتری‌ها بهتر شرایط دمایی بالا برای خشک کردن را نسبت به فرم رویشی تحمل می‌نمایند. استفاده از اسپری‌درایر نسبت به فریزدرایر سبب کاهش هزینه خشک کردن و تولید محصول می‌شود. از سوی دیگر اسپور باکتری‌ها شرایط نامناسب همانند خشکی را بهتر تحمل می‌کند از این رو عمر قفسه‌ای این گونه محصولات به نحو چشمگیری افزایش می‌یابد. از مطالب ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که سویه 75 با توانایی بالای اسپورسازی می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید محصول باشد.

– برای اطمینان از مقاومت اسپورهای تولیدی، توانایی حیات آن‌ها در شرایط مشابه سازی شده از اسپورسازی بررسی شد. آزمایشات نشان داد که سویه 75 تا 91/43٪ دمای 121 °C اتوکلاو به مدت 15 دقیقه را تحمل می‌کند. میان مقاومت دو سویه بیوشم در این شرایط برابر با 92/91 و 95/44٪ بود. این آزمایش نشان داد که سویه بومی توانایی نسبتاً مناسبی در حد سویه‌های صنعتی دارد. البته باید به این نکته نیز توجه داشت که برای خشک کردن باکتری‌ها مدت زمان بسیار کمتری (در حد چند ثانیه) در مجاورت چنین دمای بالا قرار می‌گیرند. بنابراین می‌توان از حیات کامل اسپورها در طی فرایند خشک کردن اطمینان داشت.

– یک سویه مناسب پروبیوتیک باید بتواند شرایط بدن حیوان میزبان را تحمل کرده و زنده به محل هدف برسد. آزمایش‌های صورت گرفته نشان داد که سویه 75 دارای مقاومتی بالغ بر 88/55٪ به صفرای مرغ بوده و این رقم برای دو سویه بیوشم به ترتیب برابر 69/30 و 93/26 بود. این امر نشان می‌دهد که سویه بومی دارای مقاومت مناسبی به صفرا بوده و می‌تواند پس از عبور از صفرا به تعداد مناسب به روده حیوان برسد.

– از دیگر شرایطی که یک پروبیوتیک طیور باید به آن مقاوم باشد می‌توان به شرایط اسیدی به همراه پپسین موجود در معده مرغ می‌باشد. آزمایشات نشان داد که سویه 75 در حدود 88/09 به اسید و پپسین مقاوم بود در حالی که این مقدار برای سویه‌های بیوشم برابر 72/96 و 75/88٪ بود. کاملاً مشخص است که سویه بومی دارای درصد مقاومت بسیار مناسبی نسبت به شرایط معده است. در آزمایشی دیگر مشخص شد که هر 3 سویه بعد از 2 هفته توانایی رشد در pH معادل 1 را داشتند.

– بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که سویه 75 به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های با کار گرفته (پنی‌سیلین، تتراسایکلین، لینکومایسین، نئومایسین، تایلوزین و سولتریم) حساس می‌باشد. یکی از سویه‌های بیوشم تنها به نئومایسین حساس و به مابقی آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بود. سویه دیگر به پنی‌سیلین، تایلوزین و سولتریم مقاوم بود. تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتکی اهمیت فراوان دارد. معمولاً در محصولات تجاری از سویه‌هایی استفاده می‌شود که فاقد ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند زیرا همواره امکان انتقال ژن مقاومت دارویی به سویه‌های بومی به کار گرفته در مرغداری وجود دارد. در این صورت امکان بروز مشکلات درمانی برای سویه‌های بیماری‌زا وجود دارد. البته لازم به ذکر است که در صورت شیوع بیماری و استفاده از یک آنتی‌بیوتیک ویژه در مرغداری، به کارگیری پروبیوتیک با سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مصرفی می‌تواند تا حدودی مفید واقع شود.

– یکی از مهمترین خصوصیات سویه 75 توانایی آن در ممانعت از رشد سویه‌های بیماری‌زا می‌باشد. آزمایش‌های صورت گرفته به صورت in-vitro نشان داد که این سویه می‌تواند از رشد استافیلوکوکوس‌اورئوس، سالمونلاتیفی، اشرشیاکلی، انتروباکتر و لیستریا ممانعت به عمل آورد. دو سویه بیوشم تحت این شرایط فعالیت ضد میکروبی علیه سویه‌های محک به کار گرفته نشان ندادند.

در کل می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های بومی جدا شده دارای توانایی بالای رشد و خصوصیات پروبیوتیکی مناسب می‌باشد. به نحوی که 30 سویه جدا شده دارای کارایی بالای رشدی بوده و می‌توانند در طی یک دوره تخمیری بیومس مناسبی همانند سویه‌های تجاری تولید نمایند.

از سوی دیگر این سویه‌ها توانایی مقاومت به شرایط بدن مرغ‌ها را داشته و به واسطه توانایی بالای اسپورسازی می‌توانند در طی اسپری‌درایر هم زنده و فعال باقی بمانند. در این ارتباط سویه 75 کارایی بسیار مناسبی دارد و در آینده با تکمیل آزمایش‌های مکمل از جمله آزمایش‌های ایمنی و میدانی می‌توان از آن به عنوان یک محصول پروبیوتیک بهره برد.

منابع:

1. Gibson, G.R. and R. Fuller, *Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use.* Journal of Nutrition, 2000. **130**(2): p. 391.
2. Salminen, S., et al., *Probiotics: how should they be defined?* Trends in food science & technology, 1999. **10**(3): p. 107-110.
3. Shortt, C., *The probiotic century: historical and current perspectives.* Trends in Food Science and Technology, 1999. **10**(12): p. 411-417.
4. Fuller, R., *Probiotics in man and animals.* The Journal of applied bacteriology, 1989. **66**(5): p. 365.
5. Tomasik, P.J. and P. Tomasik, *Probiotics and prebiotics.* Cereal Chemistry, 2003. **80**(2): p. 113-117.
6. Klaenhammer, T.R., et al., *Probiotics and prebiotics*.
7. Conway, P.L., *Selection criteria for probiotic microorganisms.* Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 1996. **5**: p. 10-14.
8. Boirivant, M. and W. Strober, *The mechanism of action of probiotics.* Current opinion in gastroenterology, 2007. **23**(6): p. 679.
9. Commane, D., et al., *The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics.* Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005. **591**(1-2): p. 276-289.
10. Vanderpool, C., F. Yan, and D.B. Polk, *Mechanisms of probiotic action: Implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases.* Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(11): p. 1585-96.
11. Burns, A.J. and I.R. Rowland, *Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics.* Current Issues in Intestinal Microbiology, 2000. **1**(1): p. 13.24-
12. Vanbelle, M., E. Teller, and M. Focant, *Probiotics in animal nutrition: a review.* Archives of Animal Nutrition, 1990. **40**(7): p. 543-567.
.13 Anadón, A. and R. Martínez-Larrañaga, *Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment.* Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006. **45**(1): p. 91-95.
14. Edens, F.W., *An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics.* Revista Brasileira de Ciência Avícola, 2003. **5**: p. 75-97.
15. Jin, L.Z., et al., *Probiotics in poultry: modes of action.* World's Poultry Science Journal, 1997. **53**(04): p. 351-368.
16. Simon, O., A. Jadamus, and W. Vahjen, *Probiotic feed additives-effectiveness and expected modes of action.* Journal of Animal and Feed Sciences, 2001. **10**: p. 51-68.
17. Patterson, J.A. and K.M. Burkholder, *Application of prebiotics and probiotics in poultry production.* Poultry Science, 2003. **82**(4): p. 627.
18. Jernigan, M.A., R.D. Miles, and A.S. Arafa, *Probiotics in poultry nutrition—a review.* World's Poultry Science Journal, 1985. **41**(02): p. 99-107.
19. Netherwood, T., et al., *Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract.* Applied and Environmental Microbiology, 1999. **65**(11): p. 5134.
20. Fritts, C.A., et al., *Bacillus subtilis C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens.* The Journal of Applied Poultry Research, 2000. **9**(2): p. 149.

21 . Travers, R.S., P.A.W. Martin, and C.F. Reichelderfer, *Selective process for efficient isolation of soil Bacillus spp.* Applied and Environmental Microbiology, 1987. **53**(6): p. 1263.
22 . Koransky, J.R., S.D. Allen, and V.R. Dowell Jr, *Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms.* Applied and Environmental Microbiology, 197 :(4)35 .8p. 762.
23 . Garrity, G.M., J.A. Bell, and T.G. Lilburn, *Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology.* New York, NY: Springer, 2002: p. 49–66.
24 . Kolter, R., D.A. Siegele, and A. Tormo, *The stationary phase of the bacterial life cycle.* Annual Reviews in Microbiology, 1993. **47**(1): p. 855-874.
25 . Maa, Y.F., et al., *Protein inhalation powders: spray drying vs spray freeze drying.* Pharmaceutical research, 1999. **16**(2): p. 249-254.
26 . Duc, L.H., et al., *Characterization of Bacillus probiotics available for human use.* Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(4): p. 2161.
27 . Guo, X., et al., *Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of Bacillus subtilis MA139 in pigs.* Antonie Van Leeuwenhoek, 2006. **90**(2): p. 139-146.
28 . Casula, G. and S.M. Cutting, *Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract.* Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(5): p. 2344.
29 . Setlow ،P., *Spores of Bacillus subtilis: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals.* Journal of applied microbiology, 2006. **101**(3): p. 514-525.
30 . Cook, A.M. and R.J. Gilbert, *The effect of sodium chloride on heat resistance and recovery of heated spores of Bacillus stearothermophilus.* Journal of applied microbiology, 2008. **32**(1): p. 96-102.
31 . Gurevich, I., et al., *Three clusters of Bacillus pseudobacteremia related to a radiometric blood culture analyzer.* Infection Control, 1984. **5**(2 :(p. 71-74.
32 . Urdaci, M.C., P. Bressollier, and I. Pinchuk, *Bacillus clausii probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities.* Journal of clinical gastroenterology, 2004. **38**: p. S86.
33 . Barbosa, T.M., et al., *Screening for Bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract.* Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(2): p. 968.
34 . Spanggaard, B., et al., *The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout.* Environmental Microbiology, 2002 :(12)3 .p. 755-765.
35 . Temmerman, R., et al., *Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products.* International Journal of Food Microbiology, 2003. **81**(1): p. 1-10.
36 . Charteris, W.P., et al., *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species.* Journal of Food Protection&# 174;, 1998. **61**(12): p. 1636-1643.
37 . Uhlman, L., et al., *Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of Lactococcus lactis isolated from vegetables* 1.* International Journal of Food Microbiology, 1992. **16**(2): p. 141-151.
38 . Naclerio, G., et al., *Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of Bacillus cereus.* Applied and Environmental Microbiology, 1993. **59**(12): p. 4313.
39 . Ogunbanwo, S.T., A.I. Sanni, and A.A. Onilude, *Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F 1 and Lactobacillus brevis OG 1.* African Journal of Biotechnology, 2003. **2**(8): p. 219-227.

افزایش رشد و مقاومت به ویبریو در میگوی ببری سیاه کشت شده در قفس *Penaeus monodon* تغذیه شده با پروبیوتیک باسیلوس

حافظیه، محمود ، مدیر گروه تخصصی تغذیه و غذای زنده موسسه تحقیقات شیلات ایران 5jhafezieh@yahoo.com

چکیده

باسیلوس S11 یک پروبیونت که به عنوان مکمل غذایی برای میگوی ببری سیاه کشت داده شده در قفس درون استخرهای خاکی مورد استفاده قرار گرفته است. استخر خاکی با وسعت 500 متر مربع برای این کار مورد استفاده قرار گرفت. 12 قفس (آزمایش اول) و 6 قفس (آزمایش دوم) بصورت موازی در استخر قرارداده شد. 80 میگو در هر قفس قرار داده شد و پس از 100 روز کشت با تغذیه از دو گروه کنترل غذایی UF و گروه تیماری پروبیونت PF، متوسط وزن 2/5± 25/4 و 1/2±22/0 گرم به ترتیب در آزمایش اول و دوم بدست آمد که از نظر آماری اختلاف معنی داری را با گروه های کنترل دو آزمایش اول 0/8±18/6 و دوم 0/6±18/3 گرم بدست داد(P<0.05). میزان بقا میگو بعد از 100 روز پرورش در گروه PF (6/2±76/7 درصد در آزمایش اول و 5/0±80/8 درصد در آزمایش دوم) اختلاف معنی داری را با گروه UF (11/5±65/0 درصد در آزمایش اول و 7/5±62/5 درصد در آزمایش دوم) نشان داد (P<0.05) این پروبیونت در طی زمان کشت هیچ گونه تاثیری بر کیفیت آب نگذاشت. در طی 8 روز آزمایشی تنش با ویبریو همه افراد گروه کنترل تا روز ششم از بین رفتند حال آنکه گروه تغذیه شده با PF 4/5 درصد در آزمایش اول و 9/3 درصد در آزمایش دوم بازماندگی نشان دادند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، میگوی ببری سیاه، رشد، مقاومت دمایی

مقدمه

میکروب ها هم نقش مفید و هم مضر در استخرهای آبزی پروری بازی می کنند .

Rheinheimer, 1992; Baudin Laurencin & Vigneulle, 1994; Valiela, 1995; Moriaty 1997) .

از نظر مفید بودن به عنوان ترکیبات ضروری برای غذاها و همچنین چرخه عناصر با موضوع حفظ کیفیت آب و نتیجتا برای آبزی پروری بسیار لازم و ضروری هستند(Valiela, 1995; Moriaty 1997). باکتری ها و ویروس ها می توانند باعث ایجاد بیماری های کشنده شوند و از این طریق در اقتصاد مزارع پرورشی آبزیان تاثیر منفی گذارند. ویروس سر زرد (YHV)، ویروس سندروم لکه سفید(WSSV) و باکتری *Vibrio harveyi* که باعث بیماری Luminescent می شوند سه عامل بیماریزای مهم در مزارع پرورشی میگو در کشورهای جنوب شرقی آسیا هستند که عامل و مرگ و میردرصد بالایی از میگو های پرورشی می باشند

(Flegal et al. 1992, Saargaren 1996, Lightner & Redman 1998).

برای موفقیت در کشت و پرورش میگو به فاکتورهایی چون لاروهای سالم و عاری از هر گونه بیماری، غذای مناسب، دفع فیزیکی ارگانیسم های بیماریزا، هوادهی مورد نیاز و همچنین کیفیت آب مناسب برای آبزی پروی، نیاز است. اخیرا به منظور پیشگیری مشکلات آبزی پروری، پروبیوتیک ها در این صنعت نیز وارد شده که هنوز بطور وسیع مورد استقبال قرار نگرفته اند (Fox و Holzapfel et al., 1998; 1988; Fuller, 1989, 1999;

Staley & Stanly, 1986; Gatesoupe, 1999 and Verschuere et al. 2000)

بنظر می رسد این موضوع با طیف وسیع استفاده مستقیم باکتری های زنده در استخرها که امروزه به منظور بالا بردن کیفیت آب بکار برده می شوند تضاد دارد (Boyd & Gross, 1998).

با تعاریفی که توسط Fuller, 1989, 1992, 1997; Tannock 1999 ارائه شده، باکتری هایی که بطور مستقیم به آب استخرها اضافه می شود پروبیوتیک نیستند و نمی توان آنها را با میکروب های زنده ای که به غذاها افزوده می شود مقایسه نمود. استفاده از پروبیوتیک های واقعی (آنهایی که به مواد غذایی افزوده می شوند) باعث ایجاد حفاظت آبزی در برابر باکتری ها و ویروس های بیماریزا می گردد که برای آنها راه حل درمانی و یا جایگزینی مواد شیمیایی همچون آنتی بیوتیک ها وجود ندارد و یا اینکه بدلایل زیست محیطی از استفاده مستقیم آنها خود داری می شود زیرا که آنتی بیوتیک ها دارای طول عمر طولانی مدت هستند و می توانند برای انسان که مصرف کننده آبزی است اشکال بوجود آورد.

P.monodon یا میگوی ببری سیاه با خوردن غذایی که BS11 را به همراه دارد (PF) در آزمایش تنش با باکتری های بیماریزا ، بقا بیشتری را نشان می دهد و این بدلیل افزایش پاسخ های ایمنی موجود در مقایسه با تیمار کنترل (UF) می باشد (Rengpipat et al. 2000)

به منظور تایید اثر BS11 در شرایط استخر های پرورشی ، آزمایش فوق انجام گرفت . برای این منظور تیمارها درون قفس های جداگانه و در یک شرایط محیطی قرار داده شدند. رشد، بقا و مقاومت به بیماری با کمک آزمایش تنش با عوامل بیماریزا به همان طریقی که در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفته بود در استخرها نیز آزمایش شد.

مواد و روشها

باسیلوسی که از لوله گوارش میگوی سیاه ببری مولد سالم جداسازی شده بود پس از جدا سازی و کشت به عنوان پروبیوتیک در آزمایشگاه به میگوهای سیاه ببری داده شد(Rengpipat et al. 1998).

در این مطالعه BS11 که در آگار تریپتیک سویا (TSA;Difco) ذخیره گردید در محیط آبگوشت (TSB;Difco) کشت داده و سپس به مدت 24 در دمای 30 درجه سانتیگراد در انکوباتور با 200 دور در دقیقه قرار داده شد. سلولها با سانتریفوژ 8000 دور در دقیقه در 4 درجه

سانتیگراد به مدت 15 دقیقه جمع آوری شده و سه بار با سرم فیزیولوژی استریل (کلرید سدیم 0/85 درصد) شسته شدند . بطور مداوم با آزمایش های بیوشیمیایی(API 50 CH, Bio Marieux) خلوص و هویت محیط کشت و با پایش کردن، ظهور فیزیکیBS11 روی TSA چک و تایید شد (Regnpipat et al. 1998) .

آزمایش تنش میکروبی

در این آزمایش از *V.harveyi* 1526 که از میگوهای *P.monodon* که از بیماری luminescent مرده بودند جدا شده و مورد استفاده قرار گرفت. کشت در دمای 30 درجه سانتیگراد در محیط TSB یاTSA که 2 درصد نمک طعام در آن وجود داشت انجام گردید. روش کار برگرفته از Baumann & Schubert (1984) می باشد. کلنی ویبریو روی صفحات کشت که دارای تیوسولفات سیترات و آگار (TCBS, Difco) بودندپخش شدند. سلولها بعد از 18 تا 24 ساعت بوسیله سانتریفوژ (8000دور در دقیقه) از TSB برداشت شدند . این عمل طی 15 دقیقه در دمای 4 درجه سانتیگراد انجام شد، سپس با سرم فیزیولوژی 2 درصد ، دوبار شستشو داده شدند. برای آزمایش تنش، حدود 10^{10} از کلنی ویبریو در هر گرم(یا میلی لیتر) را به محیط آب میگوها اضافه نمودیم و سرانجام کار غلظت باکتریایی را روی 10^{6} کلنی در هر میلی لیتر آب اکواریوم ثابت نگه داشتیم .

تغذیه میگوها

میگوها با غذای فرموله تجاری تغذیه شدند. در این آزمایش از دو مدل غذایی ، کنترل UF و دیگری تیمار مورد نظر PF ، یک کیلو گرم وزن تر (حدود 100 گرم وزن خشک) از باسیلوس مورد نظر با حدود 10^{10}واحد کلنی در هر گرم که با 3 کیلو غذا کاملا مخلوط شدند (حدود 2/5 درصد وزن کل غذا، باسیل مورد نظرمی باشد). PF با کمک هوادهی در دمای 28 درجه سانتیگراد و به مدت 1 تا 2 ساعت خشک گردید و در کیسه های پلاستیکی تمیز در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. غذای میگوها دو بار در هفته تهیه می گردید و هر بار آنالیزی برای شمارش کلنی ویبریو انجام می گردید.

آزمایش در قفس شماره 1

از 24 قفس های توری (با مش 1 میلی متر) با سطح 2 متر مربع و از لارو میگوهای با وزن 0/6 تا 0/9 گرمی که در این قفس ها ذخیره شده بودند استفاده گردید. در هر قفس 80 لارو میگو قرار داده شد. قفس ها در عمق 1/3 متری آب در یک استخر 500 متر مربعی طوری قرار داده شد که در کنار مسیر عبور و به منظور سرکشی راحت باشد. قفس ها از کف استخر ها 20 سانتیمتر و از سطح آب استخر 40 سانتیمتر بالاتر قرار داده شدند. 12 قفس برای میگوهای کنترل تغذیه شده با UF و بقیه برای تیمار مورد نظر در نظر گرفته شد. فاصله هر قفس با دیگری 1 متر بود ولی ردیف کنترل ها از تیمار مورد نظر 1/5 متر فاصله داشت که در طرفین متقابل مسیر عبور برای سرکشی قرار داشتند. شوری آب استخر 8 گرم در لیتر بود و پس از 100 روز مرحله کشت در فصل گرما آزمایش به پایان رسید. آب استخر

تحت شرایط سیستم بسته هوادهی می گردید . همه میگوها روزانه 3 بار به اندازه 10٪ وزن بدن خود تغذیه شدند. به گروه تیماردر هر روز دو بارUF و یک بار PF داده می شد. میزان بقا و وزن میگوها هر 20 روز یکبار از تاریخ اولین روز اندازه گیری شد.

هشت میگو در هر قفس (96 میگو در قفس های تیمار) بصورت تصادفی برای اندازه گیری وزن انتخاب می شدند و پس از اتمام اندازه گیری به قفس خود باز گردانده می شدند. در طی آزمایش ، هر روز دما و pH آب درون قفس ها اندازه گیری می شد ولی شوری ، اکسیژن محلول ، آمونیاک و فسفات هر 20 روز یکبار اندازه گیری می گردید روش کار بر اساس Rengpipat et al.,(2000) می باشد.

آزمای در قفس شماره 2

شرایط همچون آزمایش اول می باشد فقط تغییر در فصل آزمایش می باشد که در این آزمایش در فصل سرما(از نوامبر 2000 تا فوریه 2001) و در کل 12 قفس (6 مورد برای کنترل و 6 مورد برای تیمار مورد نظر) انتخاب شدند. البته وزن نمونه های میگو 0/4 گرم بودند.

آزمایش تنش با ویبریو

پس از 100 روز تلاش تغذیه ای و قبل از تنش ، میگوهای کنترل و تیمار برای مدت یک هفته در اکواریوم بتونی 0/8 متر مربعی با 180 لیتر آب) قرار داده شدند تا سازش یابند .. در طی سازش یک هفته ای ، شوری آب اکواریوم بتدریج افزایش یافت تا از 2 به 20 گرم در لیتردر روز رسید. تیمارها شامل گروهی که از PF و UF تغذیه شده بودند وتحت تنش با ویبریو قرار گرفتند و همچنین گروهی که از PF و UF تغذیه شده بودند ولی تحت تنش با ویبریو قرار داده نشدند. برای تیمار ها سه تکرار انجام شد و در هر اکواریوم 18 میگو قرار داده شد.

میگوهای تیمار دوم در معرض ویبریو با تعداد کلنی 10^6 در هر میلی لیترقرار گرفتند روش کار از Austin et al. (1995) و Rengpipat et al. (1998) گرفته شد. در طی 8 روز آزمایش هیچ تعویض آب صورت نگرفت. در طی آزمایش تنش ، پارامترهای کیفیت آب ، همچنین میزان بقا میگوها هر دو روز یکبار اندازه گیری می شد. نمونه های میگو و 200 میلی لیتر آب بصورت تصادفی انتخاب و مورد آزمایش ویبریو و باسیلوس قرار می گرفتند. روز در معرض قرار گیری با ویبریو، روز صفر در نظر گرفته شد و در روز های دوم ، چهارم، ششم و هشتم ، اندازه گیری ها انجام می شد. هر روز تعداد کل میگوهای مرده ها محاسبه گردید. در روز ششم همه گروه تغذیه شده با UF که در معرض ویبریو قرار گرفته بودند، مردند. هپاتوپانکراس روده هر میگویی مرده جدا می گردید و به منظور وجود یا عدم وجود ویبریو مورد آزمایش قرار می گرفت . برای اینکار از آگار TCBS و روش شناسایی ویبریو که قبلا گفته شد استفاده گردید. برای شمارش تعداد کلنی های موجود در آب (سه بار تکرار) حجم آب را با سرم فیزیولوژیک به یک لیتر رسانده و 0/1 میلی لیتر آنرا را به صفحه کشت TCBS (برای شمارش ویبریو) و به صفحه TSA (برای شمارش باسیلوس) گستره نمودیم . شمارش کمی باکتریها از هپاتوپانکراس روده میگو نیز بطریق بالا انجام شد.

بررسی آماری

تاثیر باسیلوس روی رشد میگو ، بقا مقاومت به بیماری در آزمایش های مکرر با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست میانگین چند دامنه دانکن انجام که P<0.05 نشان از اختلاف معنی دار دارد.

نتایج و بحث

میگو های تغذیه شده با PF دارای اختلاف معنی دار در افزایش بقا خود هستند (جدول 1) همچنین از نظر وزنی بسیار بهتر از گروه کنترل می باشند (شکل 1)(P<0.05). اختلاف وزنی از روز 20 بعد از شروع خود را نشان می دهد(شکل 1) . بعد از 100 روز متوسط وزن میگوهای تغذیه شده با PF ، 2/5±4/ 25 (ADG=0.25 تغییر متوسط روزانه) در مورد آزمایش گروه اول و 1/2±22 (ADG=0.22) در مورد آزمایش گروه دوم که در مقایسه با گروه کنترل 0/8±18/6 (ADG=0.18) می باشد. در مجموع متوسط وزن و درصد بقا آزمایش اول و دوم 23/7 گرم (ADG=0.235) و 81/7٪ برای گروه تغذیه شده با باسیلوس و 18/5 گرم(ADG=0.18) و 63/8 ٪ برای گروه تغذیه شده بدون باسیلوس بدست آمد.

این موضوع مبین آن است که 30 درصد متوسط وزن بدنی و 28 درصد میزان بقا در گروه پروبیوتیک افزایش داشته است. محصول تولیدی در 2 متر مربع 968 گرم برای گروه پروبیوتیک و 590 گرم برای گروه کنترل می باشد. که در یک هکتار 9681 و 5902 کیلو در هر هکتار محاسبه می گردد. این نتایج نشان می دهد که منفعت استفاده از پروبیوتیک که در آزمایشگاه بدست آمد (Rengpipat et al.2000) قابل تعمیم به اسخرهای پرورشی نیز می باشد. بنظر می رسد در استفاده از پروبیوتیک 0/12 دلار امریکا به ازای هر کیلو گرم تولید میگوی تازه صرفه اقتصادی داشته باشد . لذا در یک استخر با تولید 4 تن، 480 دلار افزایش تولید را در بر خواهد داشت و طبیعتا در یک مزرعه 20 هکتاری ، 9600 دلار درآمد افزوده بدست می آید.

دمای آب و دیگر پارامترهای کیفیت آب بسیار مهم هستند مثلا در ساعات 10 و 13 دامنه دمایی بین28–26 تا 31/5–29/5 درجه سانتیگراد بود. تغییرات pH از 7/4 تا 8/4 برای هر دو آزمایش ثبت گردید ولی شوری بین 3 تا 4 گرم در لیتر برای آزمایش اول و 4 تا 5 گرم در لیتر برای آزمایش دوم بدست آمد. اکسیژن محلول برای هر دو آزمایش هیچگاه کمتر از 5/7 میلی گرم در لیتر نرسید ولی ماکزیمم آمونیاک، نیترات و فسفات ، 0/05، 0/25 و 0/25 میلی گرم در لیتر بدست آمد. سختی کل بین 90 تا 140 میلی گرم در لیتر برای هر دو آزمایش بدست آمد.

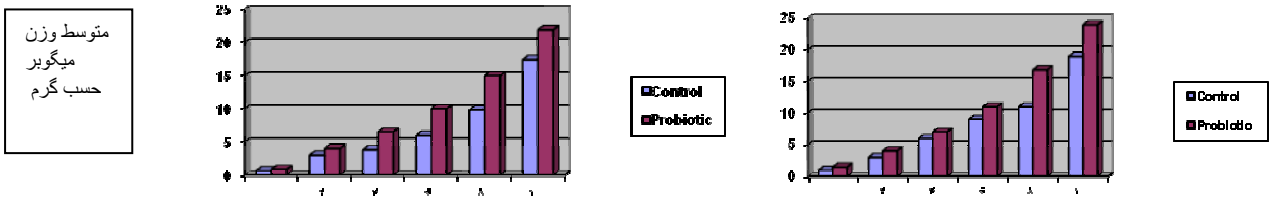
آزمایش تنش با ویبریو

میگو تغذیه شده UF در آزمایش اول و دوم بعد از روز ششم 100٪ مرگ و میر داشتند (شکل 2). بیشترین مرگ و میر از روز دوم و سوم شروع شد که حدود 70 تا 90 ٪ بود و در روز ششم به 100٪ رسید. گرچه در گروه PF نیز مرگ و میر زیادی مشاهده شد ولی

100٪ نبود. بطوریکه در روز سوم بین 45 تا 75٪ بود. در گروهی که در معرض ویبریو قرار نداشتند میزان بقا 100٪ بود. در گروه تغذیه شده با پروبیوتیک در آزمایش اول و دوم ، باسیلوس در تراکم 10^3 تا 10^5 کلنی در هر میلی لیتردر هنگام تنش با ویبریو وجود داشت در صورتیکه در گروه UF باسیلوس مشاهده نشد. غلظت ویبریو از 10^6 به 10^3 تا 10^4 کلنی در هر میلی لیتر در روز دوم کاهش نشان داد و در ادامه روزها ثابت ماند. شمارش باسیلوس در هپاتوپانکراس روده میگو های PF تغذیه شده 10^4 تا 10^6 در هر گرم قبل از شروع تنش بود که دو روز بعد از تنش کاهش یافتند(شکل 3). شمار ویبریو از روز صفر قبل از تنش به حدود 10^6کلنی در هر گرم بعد از تنش رسید و سپس در حدود 10^5 کلنی در هر گرم از روز دوم تا روز هشتم ثابت ماند . دمای آب بین 29/5-24/5 درجه سانتیگراد برای اولین تنش و 28-23 درجه سانتیگراد برای دومین بود. pH بین 8/2-7/4 برای هر دو آزمایش و اکسیژن محلول هرگز از 4/9 میلی گرم در لیتر کمتر نشد . آمونیاک، نیترات ، فسفات و سختی در طی آزمایش تنش افزایش یافتند. در آزمایش اول، آمونیاک از 0/5 به بیش از 5 میلی گرم در لیتر افزایش یافت که برای آزمایش دوم از 0/15 به بیش از 6/5 میلی گرم در لیتر رسید. افزایش نیترات از 0/08 به 2/5 در آزمایش اول و از 0/05 تا 2/5و حتی 3/5 در آزمایش دوم و فسفات بین 10-3 میلی گرم در لیتر و سختی بین 153-102 میلی گرم در لیتر تغییر داشت.

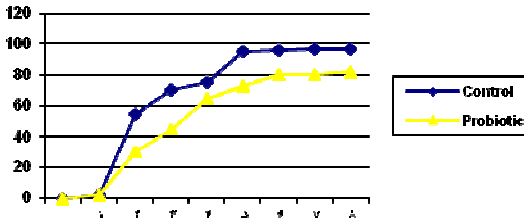
جدول 1:متوسط درصد بقا در میگوهای تغذیه شده با باسیلوس (PF) یا کنترل (UF) . هر گروه شامل 12 قفس در آزمایش اول و 6 قفس در آزمایش دوم می باشد. ($P<0.05$)

تیمار	درصد بقا	
	آزمایش اول	آزمایش دوم
کنترل UF	65_+11/5	62/5_+7/5
پرویوتیکPF	76/6_+6/2	86/8_+5



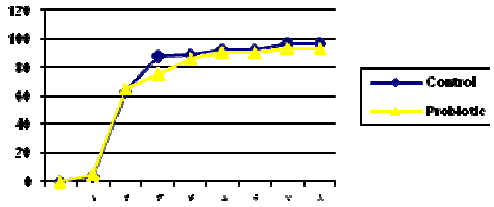
شکل1: متوسط وزن میگو تغذیه شده با باسیلوس (Probiotic) و بدون باسیلوس (Control) هر گروه شامل 12 قفس در آزمایش اول و 6 قفس در آزمایش دوم می باشد.

آزمایش دوم



زمان(روزها)

آزمایش او ل

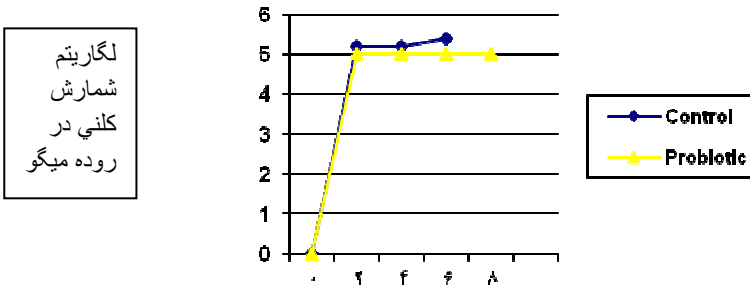


زمان(روزها)

شکل 2: میزان مرگ و میر میگو در آزمایش اول و دوم در طی 8 روز تنش با ویبریو. مقادیر، میانگین های سه تکرار هستند .

تاثیر برودت در کارآیی بهتر مقاومت باسیلوس به ویبرو در آزمایش دوم میزان مرگ و میر میگو بعد از تنش مشخص است بنظر می رسد در دمای کمتر باسیلوس راندمان بهتری از خود در مقابل ویبرو نشان می دهد. به همین دلیل در شمارش باکتریایی ویبرو در هپاتوپانکراس روده میگو طی آزمایش دوم انجام شده است که در نمودار زیر آمده است. همانگونه که مشخص است روند افزایشی تعداد ویبریو ها در گروه کنترل و ثبات شمارش آنها در گروه تیماری نشان از تاثیر رقابتی باسیلوس با آنها دارد.

آزمایش دوم



زمان (روزها)

شکل 3: شمارش باکتریایی ویبریو در هپاتوپانکراس روده میگو در طی 8 روز تنش با ویبریو در میگوهای تغذیه شده PF یا تغذیه شده UF آزمایش دوم . اعداد مبین میانگین سه بار تکرار می باشند.

به عنوان یک نتیجه کلی می توان گفت گرچه به صورت حاشیه ای ولی اثر محافظت کننده باسیلوس در مقابل ویبریو در این آزمایش مشاهده گردید . این موضوع قبلا در بعد آزمایشگاهی نیز به اثبات رسیده بود. در مجموع خارج کردن میگوها از قفس های مورد آزمایش با شوری 4 گرم در لیتر پس از 100 روز و سازش دادن آنها در شوری بالاتر (20گرم درلیتر) ، به ویبریو ها اجازه رشد و بقا در تنش با باسیلوس را می دهد و می تواند باعث ایجاد استرس در میگوها گرددو در نتیجه تاثیر مستقیمی در سیستم دفاعی آنها داشته باشد.

غلظت آمونیاک و نیترات در آزمایش تنش ، بسیار بیشتر از استخرهایی که میگوها از آنها گرفته شده بودند، می باشد. استرس حتی در حالت سمیت کم(Song et al. 1993) می تواند باعث پذیرش بیشتر میزبان برای عوامل بیماریزا گردد. شاید بهتر باشد تا زمان سازش به محیط آبی جدید سطح آمونیاک و نیترات در حد پایین تری نگهداشته شود. در آزمایشهای آینده، شاید بتوان میگو را در شوری های بالاتر رشد داد و یا یک باکتری تنش کننده ای را انتخاب کنیم که بتواند در شوری پایین مورد استفاده باشد. در این خصوص، نرخ بقا در آزمایش تنش قابل پذیرش در موقعیت استخر نیست.

منابع

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P.A.W., Effendi, I., and Griffith, D.R.W.,(1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish Dis. 18:93-96.

Baudin Laurencin, F., and Vigneulle, M.,(1994) Diseases in aquaculture operations . In : Barnabe, G. (ed.) Aquaculture biology and ecology of cultured species. Ellis Horwood, New York, p 383-390.

Baumann, P., and Schubert, R.H.W.,(1984) Vibrionaceae. In: Krieg, N.A., Holt, J.G.(eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore, p. 516-549.

Boyd, C.E., and Gross, A.,(1998) Use of probiotics for improving soil and water quality in aquaculture ponds. In : Fulks, W., Main, K.L.(eds) Diseases of cultured penaeid shrimp in Asia and United States. The Oceanic Institute, Honolulu, HI, p, 101-106.

Flegel, R.W., Fegan, D.F., Kongsom, S., Vuthikomudomkit, S., Sriurairatana, S., Boonyaratpalin, S, Chantanachookhin, C., Vickers, J.E., and Macdonald, O.D.,(1992) Occurrence, diagnosis and treatment of shrimp disease in Thailand. In : Fulks, W., Main, K.L.,(eds) Disease of cultured penaeid shrimp in Asia and United state . The Oceanic Institute, Honolulu, HI, p. 57-112.

Fox, S.M., (1988) Probiotica intestinal inoculants for production animals, Vet. Med. 83:806-830.

Fuller, R.,(1992) Probiotic: The scientific basis. First ed. London Chapman & Hall 398 pp.

Fuller, R.,(1997) Probiotic 2 Application and practical aspects. First ed. London Chapman & Hall 211pp.

Gatesoupe, F.J., (1999) The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180:147-165..

Holzapfel, W.H., Harberer, P., Snel, J., Schillinger, U., and Huis in't Veld, J.H.J.,(1998) Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol 41: 85-101.

Lightner, D.V., Redman, R.M.,(1998) Shrimp disease and current diagnostic methods. Aquaculture, 164:201-220.

Moriaty, D.J.W.,(1997) The role of microorganisms in aquaculture ponds. Aquaculture, 151: 333-349.

Rengpipat S, Phianphak W, Piyatiratitivorakul S, and Menasveta, P., (1998) Effect of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. Aquaculture, 167:301-313.

Rengpipat, S., Rukpratanporn, S., Piyatiratitivorakul, S., and Menasveta, P ., (2000) Immunity enhancement in black tiger shrimp *Penaeus monodon* by probiotic bacterium(*Bacillus* S11). Aquaculture, 191:271-288.

Rheinheimer, G.,(1992) Pathogens in aquatics plants and animals and their control. In: Rheinheimer, G.,(ed) Aquatic microbiology, 4th edn. John Wiley & Sons, Guildford, p 175-249.

Runagpan, L., (1998) Luminous bacteria associated in shrimp biotechnology. Proc Special Session on Shrimp Biotechnology 5th Asian Fisheries Forum, Chiengmai, Thailand. John Wiley & Sons, Guildford, p 205-211.

Song, Y.L., Cheng, W., and Wang, C.H.,(1993) Isolation and characterization of *Vibrio damsela* infections for cultured shrimp in Taiwan. J. Invertebr. Pathol. 61: 24-31.

Spaargearen, D.A.,(1996) Disease in cultures of tiger prawns, *Penaeus monodon* Fabricius, 1798. Crustacean, 69: 1018-1024.

Staley, J.T., and Stanley, P.M., (1986) Potential commercial applications in aquatic microbiology. Microb. Ecol. 12: 79- 100.

Statistical Analysis System, (1983) SAS introductory guide SAS Institute, Cary, NC

Tannock, G.W., Fuller, R., Pederson, K.,(1999) *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. Appl. Environ. Microbiol 56: 1310-1316.

Valiela, I.,(1995) The carbon cycle: production and transformation of organic matter. In: Flegel, T.M.,(ed) Marine Ecological processes, 2nd edn. Multimedia Asia, Bangkok, p 385-461.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., andVerstraete, W., (2000) Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture. Microbiol Mol. Biol. Rev. 64: 655-671.

Increase of growth rate and resistance to Vibrio sp. in Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed with Probiotic Bacterium (*Bacillus* S11) Culture in Net Cages

Mahmoud Hafezeh; Feeding and Live food Division manage, Aquaculture Department, r Iranian Fisheries Research Organization

Bacillus S11 (BS11), a bacterial probiont, was used as feed supplement for

black tiger shrimp culture in net cages located in the same earthen pond. An outdoor,

earthen pond the area of 500 m2 with one water system was used. Twelve net cages

(Experiment I) and six net cages (Experiment II) were parallely set in the pond.

Eighty shrimp in one cage (~2 m2) was arranged, after 100 days of culture probiont shrimp mean weights (25.4 ± 2.5g and 22.0± 1.2g in Experiments I and II) were significantly greater ($p<0.05$) than control shrimp mean weights (18.6± 0.8 g and 18.3 ±0.6 g in Experiments I and II, respectively). Shrimp survival after 100 days was significantly greater ($p<0.05$) in the probiotic (76.7±6.2% in Experiment I and 80.8±5.0% in Experiment II) compared with the control (65.0±11.5% in Experiment I and 62.5±7.5% in Experiment II). There were no obvious effects of BS11 on water quality in the pond during culturing shrimp in either Experiments I or II. During the 8-day challenge test collected shrimp of control groups from both experiments totally died on Day-6 whereas probiotic groups were still alive -4.5% and -9.3% in Experiment I and II, respectively.

جداسازی و شناسایی سویه های بومی و تولید نیمه صنعتی سویه های پروبیوتیکی در بیوراکتورها

میردامادی سعید ، فلاح پور مسعود ، عزیز محسنی فرزانه**

عضو هیئت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ، 6 Mirdamadi_sa@yahoo.com

امروزه پروبیوتیک ها به عنوان عوامل درمانی بسیاری از بیماریهای گوارشی، عوامل افزایش رشد، تامین ویتامین ها ، اسیدهای آمینه و ممانعت کننده از رشد بسیاری از عوامل پاتوژن در داخل بدن و یا در محیط زیست مطرح شده اند . در ژاپن هشتاد نوع Functional food وجود دارد که بنام FOSHO که پروبیوتیک ها نیز از آن جمله هستند. پروبیوتیک از سال 1997 در جهان مصرف گسترده یافت و بسیاری از صاحبان صنایع لبنی به تولید آن روی آوردند. مطالعات انجام شده در 9 کشور اروپائی، انگلیسی، فرانسه، آلمان، اسپانیا، بلژیک، هلند، دانمارک، فنلاند و سوئد نشان داده است که در سال 1997، مصرف پروبیوتیک ها 250 میلیون کیلو گرم بوده است که از این مقدار 90 میلیون کیلوگرم به ارزش 219 میلیون دلار مربوط به کشور فرانسه است. بیفیدوباکترها و باکتری های لاکتیکی از پروبیوتیک ها هستند که بطور وسیعی در غذای انسان و حیوان استفاده می شوند. آنها علاوه بر تولید ویتامین ها و فاکتورهای رشد متعدد، چندین عامل ممانعت کننده رشد میکروبی نظیر اسید لاکتیک ، باکتریوسین و بخصوص نیسین تولید می نمایند نیسین تنها باکتریوسینی است که تاکنون به عنوان نگهدارنده مجاز کاربرد غذایی یافته است . در یک سری مطالعه لاکتوباسیل ها و بیفیدو باکترهای بومی ایران از لبنیات محلی شهرستانهای مختلف جداسازی گردیدند. سویه ها از نظر تولید اسید لاکتیک ، باکتریوسین ، کاتالاز و عوامل دیگر ممانعت کننده از رشد مورد ارزیابی قرار گرفت . سویه های جدید جداسازی شده ثبت گردید و مراحل تولید نیمه صنعتی پروبیوتیک ، نیسین ، استارتر کالچر های صنایع لبنی و اسید لاکتیک در فرمانتورهای نیمه صنعتی 20، 40 و 750 لیتری مورد ارزیابی قرار گرفت. پروبیوتیک های تولیدی در ماست ، پنیر و نیسین تولیدی نیز به فرم های نانوفرمولاسیون در لیپوزوم و بصورت آزاد در پنیر و بر روی سویه های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی ارزیابی گردید.

واژه گلیدی: پروبیوتیک ،جداسازی ، فرمولاسیون ، تولید ، ارزیابی

Isolation and Identification of native strains and pilot plant production of probiotic strains

Mirdamadi Saeed, Fallahpour Masoud, Aziz Mohseni Farzaneh**

Associated Professor Mirdamadi_sa@yahoo.com

Iranian research organization for Science and Technology, (IROST), 71, Forsat Str., Tehran, ,IRAN

Probiotic are concerned as a health promoting bacteria and a natural preservation technique. They can also produce bacteriocin, vitamins, amino acids and microbial growth inhibitors . FOSHO is a group of functional foods which are producing in Japan. The consumption rate of Functional foods and probiotic products in European countries especially France are increasing rapidly in recent years. We isolated several Bifidobacter strains and lactic acid bacteria from Iranian dairies. After identification , all of them examined for production of lactic acid, bacteriocin, protease and other bacterial growth inhibitors. We also produced in laboratory and pilot plant scale several strains of probiotic. We will discuss the results of our researches such as , isolation , and production of Bifidobacter strains, lactic acid bacteria, nisin, other bacteriocins , lactic acid and starter culture of dairy products in large scale bioreactors in this paper . In this studies the inhibitory effect of probiotic bacteria against *L. monocytogenes* , *S.aureus*, *E. coli* and other pathogenic and food spoilage microorganisms was investigated. The rate of nisin production was also assessed. In another experiment, minimal inhibitory concentration, MIC, of standard nisin against these pathogens were obtained using serial dilution technique. UF cheses with 3 treatments, include introducing *probiotics,* free nisin and nano- capsules of nisin (encapsulated in liposome) , and effect of these parameters were studied continuously. Among these three treatments, using *probiotic strains* showed the best result in both in vitro and in cheese studies. In addition, encapsulation protected nisin against cheese fat and protease. It also controled the direct effect of nisin on starter culture. Therefore, using encapsulated nisin was more effective

Probiotic, Isolation, Production, Formulation, assessment

مقدمه:

کلمه پروبیوتیک توسط Lilly و Still معرفی شد تا ماده ای را توصیف کند که توسط یک میکروارگانیسم تولید شده و رشد سایر میکروارگانیسم ها را تحریک کند. از آن پس تعاریف متعددی ارائه شدند که بستگی به درک از مکانیسم اثرات آنها بر سلامتی انسان داشت. به گفته Fuller پروبیوتیک ها مکمل های غذایی- میکروبی زنده ای هستند که به طور مفیدی بر سلامتی میزبان خود از طریق بهبود بالانس میکروبی روده اثر می گذارند.(2،1) پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند، که در صورت مصرف میزان مناسب، یکسری ویژگی های سلامتی بخش را برای میزبان خود فراهم می کنند. این باکتری ها می توانند طی عبور از دستگاه گوارشی زنده بمانند.(4،3) پروبیوتیک ها سلامتی بشر را با بهبود تعامل میکروفلور روده ای بر ضد پاتوژن ها تحت تاثیر قرار می دهند. در صورت بکارگیری در سیستم های غذایی به دلیل داشتن خواص تغذیه ای همراه خواص پزشکی و درمانی، جزء غذاهای فرا ویژه Functional food طبقه بندی می شوند. (5)

یک پروبیوتیک موفق و قدرتمند باید دارای یکسری ویژگی های مناسب جهت ایجاد اثرات خود باشد.برخی از این ویژگی ها شامل منشاء انسانی داشتن، پایداری به صفرا و اسید ، چسبیدن به جداره موکوسی روده ، ایمن برای استفاده غذایی ، قادر به حفظ و بقاء در طی فرایند و نگهداری باشند ، فعالیت آنتاگونیستی علیه پاتوژن ها داشته باشند. (7،6)

خواص بسیار زیادی در ارتباط با مصرف این میکروارگانیسم ها گزارش شده است. برخی از این ویژگی ها عبارتست از : متابولیسم کلسترول و در نتیجه کاهش کلسترول سرم، در دسترس کردن عناصر مهم و مواد معدنی، (به عنوان مثال کاهش pH باعث افزایش دسترسی کلسیم می شود.) تولید ویتامین ها بخصوص ویتامین های ی گروه ب ، جلوگیری از سرطان از طریق متابولیزه کردن مواد سرطانزا و

افزایش قدرت ایمنی سلولی بدن و در نتیجه بهبود و ارتقاء سیستم ایمنی (افزایش سیستم ایمنی بویژه در هنگام التهابات و کاهش سیستم ایمنی در هنگام آلرژی، در واقع یک نقش تنظیم کنندگی ایفا می کنند)، بهبود حرکات روده، تسکین یبوست و کاهش زمان اسهال، کاهش زمان اسهال بخصوص اسهال ناشی از روتاویروس ها، این باکتریها با تولید آنزیم بتا گالاکتوزیداز باعث هیدرولیز لاکتوز شیر و قابل استفاده شدن شیر برای افرادی که عدم تحمل به لاکتوز دارند(Lactose Intolerance) می گردد. (13و 14) ، فعالیت ضد پوسیدگی دندان توسط کاهش تعداد و فعالیت میکروارگانیسم های عامل پوسیدگی و تولید ماده ضد باکتریایی و مهار باکتری های پاتوژن.(6،5)

بیفیدوباکتریوم ها اولین بار در سال 1906 توسط Tissier از مدفوع نوزادان تغذیه شده از شیر مادر در انستیتو پاستور پاریس جدا شدند(9،8). بیفیدو باکتر ها جزء اولین باکتریهایی هستند که در دستگاه گوارش نوزادان جایگزین می گردند.

باکتری های اسید لاکتیک نظیر لاکتوباسیل ها و لاکتوکوکوس ها گروه مهم دیگر پروبیوتیک ها هستند که تعدادی از آنها جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان می باشند. این باکتری ها علاوه بر تولید فاکتور های گفته شده با تولید اسید لاکتیک نیز در کنترل رشد عوامل بیماریزا موثرند. (12،11،10) شیر از جمله محصولاتی است که در آن از این باکتری استفاده می شود. در این بین محصولاتی که تخمیر شده اند مفید ترند زیرا به پروبیوتیک اجازه فعالیت و در نتیجه تولید متابولیت هایشان را می دهند. متابولیت تولید شده طیف وسیعی از مواد با خاصیت ضد میکروبی و ارتقاء دهنده سلامتی را، در بر می گیرند.(7) این مقاله گزارش یک پژوهش گسترده است که هدف آن جداسازی این گروهها از محصولات لبنی و سیستم گوارشی ، شناسایی سویه های جدید که خاص ایران است، بررسی برخی خواص انها نظیر تولید باکتریوسین ها ، تخلیص ، تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی ، طیف اثر میکروبی باکتریوسین مجازی نظیر نیسین و نانوفرمولاسیون و استفاده در مدل های غذایی جهت بررسی اثرات نگهدارندگی (preservative) ان در دو مدل استفاده آزاد و یا محصور در لیپوزوم ها و کیتوزان–آلژینات بصورت نانو ذره (Entrapment) و Scale up تولید در شرایط نیمه صنعتی است.

مواد و روشها :

این تحقیق در دو فاز انجام شد. در فاز اول تمام کارها در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و در فاز دوم پنیر به عنوان نمونه غذایی ساخته و مورد بررسی قرار گرفت. سوش های میکروبی استاندارد شامل تست استرین هایی *نظیر* *Lactococcus lactis* PTCC 1336 (ATCC 11454)، *L.monocytogenes* PTCC 1301(ATCC 19117), *S.aureus* PTCC 1431 (ATCC 25923) , *E.Coli* PTCC 1399 (ATCC 25922) , *Micrococcus loteus* PTCC 1169 (ATCC 10240) که از مرکز کلکسیون باکتری ها و قارچ های ایران واقع در سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شدند . (16،15)

نگهداری سوش های میکروبی:

برای این منظور از گلیسرول 20٪ و شیر پس چرخ (skim milk) 15٪ استفاده گردید. اسلنت های حاوی محیط کشت مناسب توسط هر سوش کشت داده شد و بعد از رشد سطح اسلنت ها توسط گلیسرول 20٪ و skim milk 15٪ شسته شد و مایع شستشو که حاوی سوش مورد نظر بود درون ویالهای اپندورف استریل ریخته شد و سپس در 80- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.(15،17)

جداسازی باکترها:

محیط های mMRS ، BFM ، MRS-NLPN ، Dicloxacillin-Propionic acid ، MRS Raffinose agar و Bifidus Selective Medium(9) جهت جداسازی بیفیدو باکترها و MRS و M17 جهت جداسازی باکتر های لاکتیکی استفاده گردید (15،16، 18،19). شناسایی سویه ها توسط تست های بیوشیمیایی و 16Sr DNA انجام گردید(9).

رسم منحنی رشد استاندارد برای هر باکتری:

جهت بررسی نحوه رشد و محاسبه رشد ویژه (Specific growth rate) باکتری ها ، منحنی رشد هر باکتری تحت شرایط استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا محیط کشت مناسب برای کشت باکتری ها انتخاب گردید. سپس باکتری مورد نظر را درون 10 میلی لیتر محیط کشت تلقیح و پس از گرم خانه گذاری ، به 50 میلی لیتر محیط کشت است تلقیح و در شیکر انکوباتور در شرایط 30 و 37 درجه سانتی گراد 150 rpm قرار داده و در فواصل زمانی 4 ساعته نمونه گیری شد. سپس میزان جذب کدورت در 600 نانومتر (OD_{600})، pH و تعداد باکتری ها مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین کانت و تعداد باکتری ها از تکنیک pour plate استفاده شد(16؛ 19)

برای تعیین میزان باکتریوسین از روش انتشار در آگار یا Agar diffusion استفاده شد (15، 18).

بررسی اثر کشت توام بر باکتری های پاتوژن و رسم منحنی رشد:

برای این منظور 10µL از کشت 16 ساعته یا اصطلاحا over night *لاکتوکوکوس لاکتیس* به همراه 10 µl از کشت 16 ساعته *لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی* (هر کدام در نمونه های جداگانه) به 5 mL محیط کشت MRS تلقیح می شوند. باکتری پاتوژن مورد بررسی بصورت جداگانه در کنار کشت توام کشت داده شد و روند رشد آن نیز به بصورت خالص به عنوان شاهد بررسی گردید. سپس لوله ها در شیکر انکوباتور در شرایط 30c° و 150 rpm گرم خانه گذاری می شوند. هر 4 ساعت نمونه برداری صورت می گیرد. و منحنی رشد هر باکتری در محیط های افتراقی بررسی شد(15).

ساخت پنیر:

در این مرحله از پروژه از پنیر به عنوان یک مدل غذایی جهت بررسی عملکرد باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* و نیسین در مهار رشد پاتوژن های مورد نظر استفاده شد. برای تولید پنیر از رنت استفاده شد. 0/1 گرم از پودر رنت را در 20 mL آب مقطر استریل حل کرده و mL 0/2 به ازای هرmL 100 ریتنتیت می شود. برای ساخت پنیر UF شیر تغلیظ شده توسط اولترافیلتراسیون یا همان ریتنتیت استارتر زده شده (Retentate) از کارخانه بل سحر (محصول پنیر UF با نام روزانه) تهیه شد. ریتنتیت درون ارلنهای 5 لیتری حمل شد و 1٪ نمک نیز به آن افزوده شد. سپس آنرا درون چهار ارلنهای مختلف تقسیم و چهار گروه پنیر برای هر باکتری پاتوژن بصورت جداگانه شامل پنیر استاندارد، پنیر همراه باکتری پاتوژن ، پنیر حاوی باکتری پاتوژن و پروبیوتیک ، پنیر حاوی باکتری پاتوژن و نیسین ، پنیر حاوی باکتری پاتوژن و Encapsulated nisin ساخته شد. منحنی رشد هر عامل در این نمونه هاتا 2 ماه بررسی گردید.

نتایج و بحث :

مدفوع نوزادان استریل می‌باشد اما فوراً بعد از تولد بوسیله باکتریها کلونیزه می‌شود. در نوزادان 1 تا 2 روزه انتروکک‌ها یا کلستریدیوم به سرعت زیاد شده و غالب می‌شوند. تحقیقات نشان می دهد که در پاسخ به افزایش بیفیدوباکترها کلی فرم‌ها و دیگر باکتریها رشدشان محدود می‌شوند . 99٪ باکتریهای مدفوع نوزادان که از شیر مادر تغذیه می کنندرا بیفیدوباکترها تشکیل می‌دهند. این درحالی است که در نوزادانی که از شیر مادر تغذیه نمی کنند این رقم به 95٪ می‌رسد. بیفیدوباکترها در افراد جوان بیشتر است و با حضور باکتریهای هوازی و بی هوازی کاهش می‌یابد .بیش از 100 نوع باکتری در روده انسان است که باکتریهای روده را می‌توان به انواع مضر ـ مفید یا خنثی از نظر دخالت در سلامت انسان تقسیم‌بندی کرد. از باکتریهای مفید بیفیدوباکتریها و لاکتوباسیل ها را می توان نام برد این باکتریها در هضم، افزایش ایمنی، مهار رشد پاتوژن‌ها دخیل‌اند (21،20) . E . Coli، کلستریدیوم، پروتئوس و برخی انواع باکتروئیدها مثالهایی از باکتریهای مضراند اینها انواعی از ترکیبات مضر مانند آمین‌ها، اندولها، هیدروژن سولفات یا فنل‌ها را از تجزیه مواد غذایی تولید کرده و برای روده مشکلاتی ایجاد می نمایند. علاوه بر این این باکتریها ، گاهی باکتری های پاتوژننیز در زوده رشد و باعث بیماری می گردند. انواع این باکتری ها در بررسی 100 نمونه از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بررسی و توزیع انها در نوزادان زیر یک سال ، کودکان، بزرگسالان و افراد با ضعف ایمنی بررسی گردید. مقایسه فراوانی فلور روده در مناطق مختلف سیستم گوارش افراد بالغ توسط محققین مختلف نشان می دهد که تعداد انتروباکترها در معده حدود 10^2–0 ، در ژژنوم حدود 10^3–0 ، در ایلئوم حدود 10^7–10^2 و در کلون حدود 10^{10}–10^4 می باشد. تعداد استرپپوکوکوس ها در معده حدود 10^3–0 ، در ژژنوم حدود 10^4–0 ، در ایلئوم حدود 10^6 10–10^2 و در کلون حدود 10^{10}–10^5 است. تعداد لاکتوباسیلوس ها در معده حدود 10^3–0 ، در ژژنوم حدود 10^4–0 ، در ایلئوم حدود 10^5 10–10^2 و در کلون حدود 10^{10}–10^6 و باکتری های بیهوازی نظیر بیفیدوباکترها در معده بندرت دیده می شود ، در ژژنوم حدود 10^4 10 –0 ، در ایلئوم حدود 10^9 10–10^3 و در کلون حدود 10^{12} 10–10^8 بوده و استرپتوکوکوس ها در معده بندرت دیده شده ، در ژژنوم حدود 10^3 10–0 ، در ایلئوم حدود 10^6 10–10^2 و در کلون حدود 10^{12}–10^{10}عدد می باشد(21،20).

در این تحقیقات 100 نمونه باکتری های لاکتیکی (18،19،17) و 56 نمونه بیفیدو باکتر جدا سازی شد (9) که 5 سویه جدید لاکتو باسیل و 6 نمونه جدید بیفیدو باکتر از مواد لبنی بومی ایران گزارش شد . نتایج بررسی ها نشان داد که استفاده از موادی مانند ال سیستئین ، کلرید لیتیم ، اسید پروپیونیک و همچنین آنتی بیوتیک های اختصاصی میوپیروسین ، پاروماپسین برای ارتقاء رشد بیفیدوباکتر ها و جلوگیری از رشد سایر گونه های همراه ضروری است .(9) یکی از ضروری ترین عملیات در یک پروژه تحقیقاتی بیوتکنولوژی، حفظ و نگهداری میکروارگانیسم ها به طریقی است که بتوان آنها را جهت بهره برداری مجدد مدتها طوری زنده در اختیار داشت که خصوصیات خود را حفظ نماید. بطور معمول این عمل با کاهش فعالیت های متابولیکی سلول همراه است. از آنجایی که روند انجام آزمایشات طولانی بوده و از طرفی احتمال تضعیف و یا آلوده شدن باکتری ها طی این مدت وجود دشت لذا نمونه هابصورت آمپولهای فریزری در 80- ذ درجه سانتی گراد وبصورت لیوفیلیزه نگهداری شد.

در سال های اخیر گزارشهای متعددی در ارتباط با باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک منتشر شده است. (22) نیسین اولین باکتریوسین مجاز از نظر مصرف در مواد غذایی می باشد. این باکتریوسین روی باکتری های اسید لاکتیک، استافیلوکوکوس اورئوس ، لیستریا مونوسیتوژنر، گونه های مختلف باسیلوس و کلستریدیوم اثر مهاری دارد و همچنین ازرویش اسپور با سیلوس و کلاستریدیوم ها جلوگیری می کند. بطور کلی نیسین روی باکتری های گرم مثبت موثر بوده ولی بر گرم منفی ها به تنهایی تاثیری ندارد.(18، 15،16)

بررسی نحوه مهار پاتوژن ها توسط سوش مولد نیسین ،یعنی *لاکتوکوکوس لاکتیس*، ضروری است. از آنجا که لیستریا منوسیتوژنز به عنوان یکی از عوامل سقط جنین شناسایی گردیده است (23) و در ایران اثر سروتایپ های مختلف آن در سقط جنین بررسی و سروتایپ های عامل شناسایی گردیده (24) و این باکتری از شیر آلوده قابل انتقال است ما لیستریا را به عنوان یک باکتری مهم در سلامت جامعه مورد بررسی دقیق قرار دادیم. نتایج کشت توام *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داد که تعداد این باکتری قبل از ورود به فاز لگاریتمی رشد بطور کامل به صفر رسید. ازطرفی در کشت توام با *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد آن به تدریج کاهش یافت و زمان به صفر رسیدن آن بیش بسیار طولانی تر از لیستریا منوسیتوژن بود. در مورد *اشریشیا کلی* تعداد آن در طی کشت توام از 10^5 CFU/mL در لحظه صفر، تجاوز نکرد و از طرفی کاهشی هم مشاهده نشد. در واقع *لاکتوکوکوس لاکتیس* یک اثر مهار رشد را در مورد *اشریشیا کلی* داشت. این نتیجه در مورد استفاده از نیسین در پنیر صادق نبوده و نیسین به کمک پارامتر های از جمله استارتر کالچر های دیگر موجود در پنیر تعداد اشرشیا کلی را بشدت کاهش داد (15). بیشترین میزان نیسین در فاز لگاریتمی رشد *لاکتوکوکوس لاکتیس* تولید شد (16) در مرحله بعد این پژوهش پنیر UF به همراه سه تیمار مختلف یعنی حضور *لاکتوکوکوس لاکتیس*، نیسین آزاد و لیپوزوم های حاوی نیسین تولید شد. هر سه باکتری مورد آزمایش بطور جداگانه به میزان 10^5 CFU /g (به ازای هر گرم پنیر) به ریتنتیت تلقیح شدند و روند مهار آنها طی حدود 50 روز نگهداری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کاهش معنی دار تمام نمونه های پاتوژن بکار رفته در پنیر را نشان داد.(15)

لیپوزوم ها (15) و نانو کپسول ها ی کیتوزان – آلژیناتی (25) حاوی نیسین بطور موثری غلظت نیسین را در طول مدت نگهداری پنیر بصورت یکنواخت نگه داشتند. از طرفی از تاثیر مستقیم نیسین بر استارترها جلوگیری نمودند. با توجه به نتایج بدست آمده استفاده از لیپوزوم می تواند فعالیت و پایداری نیسین را بطور موثری در مقایسه با نیسین آزاد افزایش دهد. از آنجا که استفاده از پروبیوتیک های مولد باکتریوسین ها نیز به طور موثری در غذاهای تخمیری می تواند مانع رشد میکروارگانیسم های پاتوژن گردد. و بدلیل افزایش جمعیت آنها روی سطح موکوس وپرزهای روده،تولید مواد ضد رشد طبیعی(نظیر نیسین از لاکتوکوکوس لاکتیس و اسیدوفیلین تولید شده از L . acidophilus) ، تولید پراکسید هیدروژن و کاهش pH باعث مهار رشد باکتری های پاتوژن ها گشته بطوریکه کاهش کلی فرم هاتوسط انها تا حدود 90٪ گزارش شده است. سنتز اسیدهای آمینه مختلف نظیر اسید آمینه لیزین (که توسط L. Plautarum تولید می شود)، افزایش لوکوسیت‌ها وتولید آنتی بادی ها، افزایش جذب پروتئین هادر روده ، افزایش حرکات سیستم دستگاه گوارش ، تولید ویتامین‌های گروه B مانند : اسیدفولیک، نیاسین، ریبوفلاوین، B_{12} و B_6 و اسید پانتوئیک ، افزایش ایمنی بدن و کاهش بیماریهای گوارشی نیز از جمله فواید آنها می باشد. لاکتوباسیل‌ها فاکتورهای ضد کلسترولمیا و ضد لیپیدمیا را تولید کرده و از این طریق منجر به گونه‌های کاهش کسترول و چربی خون می شوند . مطالعات مرکز تحقیقات سرطان Sloan Kettering و دانشگاه Nebraska نشان داد که لاکتوباسیلوس‌ها یک فعالیت ضد توموری داشته و باعث مهار تکثیر تومور می‌شوند . پیشنهاد می گردد در رژیم غذایی گروه های سنی مختلف حتی نوزادان از این باکتری ها بطور وسیع استفاده گردد. مراحل تولید نیمه صنعتی در فرمانتورها و استفاده صنعتی آنها در سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران در حال انجام می باشد.

منابع:

1- Belfior, C., Castelano, P., Vignolo, P. 2007. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. Food Microbiology. 24, 223-229.

2- Degnan, A. J., Kaspar, C. W., Otwell, W. S., Tamplin, M. L., Luchansky, J. B. 1994. Evaluation of Lactic Acid Bacterium fermentation products and food-grade chemicals to control *Listeria monocytogenes* in Blue crab (callinectes sapidus) meat. Appl & Env Microbiol. 60(9), 3198-3203.

3- Hamama, A., Hankouri, N. E., Ayadi, M. E. 2002. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. International Dairy Journal. 12, 933-938.

4- Avonts, L., Uytven, E.V. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus strains* in different media.International Dairy Journal. 14, 947-955.

5- Bergamini, C. V., Hynes, E. R., Zalazar, C. A. 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of a semi-hard cheese. Int Dairy J. 16, 856-866

6- Gagnon, M., Kheadr, E. E., Blay, G. L., Fliss, I. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coliO157:H7* by *bifidobacterial strains* human origin. Int. J. Food Microbiol. 92, 69-78.

7- Parves, S., Malik, K. A., Kang, A., Kim, H.-Y., 2006. Probiotic and fermented food products are beneficial for health. J of Appl Microbiol. 100, 1171-1185

8- Ogava, M., Shimizu, K., Nomoto K., Tanaka, R., Hamabata T., Yamasaki S., Takeda T., Takeda Y., 2001, Inhibition of in vitro growth of Shigela toxin-producing Escherichia coli O157:h7 by probiotic Lactobacillus strains due to production of lactic acid., Int. J. Food Microbiol. 68 135-140

9-Isolation and identification of bifidobacterium sp. In Iranian traditional dairy products 2008 Heidarpour M., Mokhtari F., Mirdamadi S., Ghorashi A., Research j., of biological Sciences 3(9):979-983

10- Batch and fed batch production of L(+)lactic acid ., 2005, Mirdamadi, S, Rajabi, A, Akbarzadeh, A, J BIOTECHNOL 118: S106-S107 Suppl. 1 AUG

11- Lactic acid Production by lactobacillus strains ,(2007) Mirdamadi S., Rajabi A., Aziz Mohseni F., Momen B., Iranian Journal of Sciences & Food Technology , 2(3), 57-65

12- Mirdamadi S., Atashgahi S., Rajabi A., Mohseni F., Roayaei M., Hamedi J., 2008, Cell entrapment of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 39392 for lactic acid production , IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY, 6(1) January 2008 :18-21

13- Production of beta-Galactosidase in submerged media by Asp. oryzae , PTCC 5163 , 1997, Mirdamadi S., Moazami N., Gorgani , J.Science. IRI, (1),23-28

14-Continuous hydrolysis of lactose milk and whey by immobilized beta- galactosidase, 2007, Mirdamadi S., Moazami N., Annals of Nutrition & Metabolism , 51(supp l),135-135, 2007

15- Production and Nano-Formulation of Nisin in Liposome as a slow Release Preservative Against Important Food-Born Pathogens in Uf Cheese,2009, S. Mirdamadi, S. Agha Ghazvini, H. Taffresh , New Biotechnology , 2009, Volume 25, Suppl. 1 , Elsevier, ISSN: 1871-678

16- Effect of nonnutritional factors on nisin production, 2010, Say-yed Hesameddin Tafreshi, Saeed Mirdamadi, Dariush Norouzian, Shohreh Khatami, Soroush Sardari , African Journal of Biotechnology, 9(9), 1382-1391, March 2010, ISSN 1684-5315

17- Isolation and Identification of Iraianian native yoghurt ,2005, Pourahmad, R., Mazaheri Assadi M., Mirdamadi S.,Pajouhesh and Sazandegi No 65 pp: 42-48 ,

18- Screening of lactobacillus strains for bio-preservative production and probiotic activities from Iranian Yogurt.,2007, Mirdamadi S., Aziz Mohseni F., Fallahpour M., Tangestani M., Annals of Nutrition & Metabolism , 51(supp l), 159-159 , 2007

19- Study of Anti bacterial effects of Isolated Iranian Native starter cultures ., 2006., Poor Ahmad R., Mazaheri Asadi.M., Mirdamadi S., Food Technology & Nutrition, Winter 2006, vol. 3, No 1.,23-32

20- Probiotics in Human Disease Part I , M. Painter, D.C., 2001, (Jun); 73 (6): 1142S–1146S 8 Am J Clin Nutr

21- Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero-and uro pathogens (2006) , P. Hutt , J. Shchepetova, K.Loivukene, T.Kullisaar and M.Mikelsaar , Journal of Applied Microbiology ISISSN1364-5072, 100 , 1324–1332

22- Cintas, L. M., Casaus, P., Fermandez, M. F., Hernandez, P. E. 1998. Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborn pathogenic bacteria. Food Microbiology. 15, 289-298.

23- Rate of Listeria Abortion in Tehran, 1994, Mirdamadi , S. , Moazami N., Rafiei, T., Medical Journal of IRI MJIRI), 8(1),1-4

24- Determination of Dominant Serovars of Listeria monocytogenes . 1994, Mirdamadi , S. , Moazami N., Rafiei, T., Medical Journal of Islamic Republic of IRAN (MJIRI), (3) ,173-175

25- Polymeric NanoParticles: Production, applications and Advantage.,2009, M. Zohri, T. Gazori, S. Mirdamadi , A. Asadi, I. Haririan ,The internet journal of nanotechnology, ISSN 1937-8262

نگاهی گذرا بر پروبیوتیک‌ها و فرآورده‌های لبنی پروبیوتیک

سیدامیرمحمد مرتضویان–استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی– دانشکده تغذیه و صنایع غذایی

1. تعاریف و مفاهیم کلی

پروبیوتیک‌ها (probiotics) میکروارگانیسم‌های زنده ای هستند که اساسا با فعالیت های زیستی در روده و حفظ توازن فلور میکروبی سودمند و مضر، اثرات سلامت‌بخش برای میزبان (حیوان و انسان) دارند. بر هم خوردن این توازن در اثر عواملی همچون سالخوردگی، رژیم نامناسب غذایی، تنش، کم خوابی و در معرض پرتوهای رادیواکتیو بودن به ایجاد انواع بیماری ها منجر می شود.

پری‌بیوتیک ها (prebiotics)، ترکیبات هضم‌ناپذیر یا هضم‌پذیر اندک در برابر آنزیم های گوارشی بدن انسان (اساسا ترکیبات الیگوساکاریدی) هستند که رشد و/ یا فعالیت میکروارگانیسم های پروبیوتیک را به طور انتخابی تحریک می کنند. سین‌بیوتیک ها (synbiotics) به طور توام دارای پروبیوتیک ها و پری بیوتیک ها هستند. کاربرد توام دو عامل یادشده با هدف ایجاد هم‌افزایی (synergy) در اثرات سلامت‌بخش آن ها صورت می گیرد. فرآورده های پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و سین‌بیوتیک از جمله فرآورده های غذایی فراسومند (functional foods) به شمار می آیند.

2. تاریخچه

اگرچه بیش از صد سال از ارائه مفهوم پروبیوتیک توسط مچنیکوف (Metchnikoff) می گذرد، تولید صنعتی و مصرف فرآورده های غذایی پروبیوتیک پیشینه ای بیش از چهل سال ندارد. در کشور ما این سابقه از هشت سال متجاوز نیست. پیش از رواج مصرف پروبیوتیک ها توسط انسان، فولر (Fuller) با تالیفات و برنامه های اجرایی خود سبب گسترش مصرف پروبیوتیک ها در دام، به عنوان جایگزین پادزیست، شد. از آن پس، تولید فرآورده های خوراکی پروبیوتیک به صورت فرآورده های دارویی (قرص، کپسول و آمپول) و

انواع فرآورده های غذایی رواج یافت. فرآورده های لبنی پروبیوتیک و به ویژه ماست، هنوز پرمصرف ترین و مقبول ترین مواد غذایی پروبیوتیک هستند. از دیگر محصولات لبنی پروبیوتیک می توان به انواع پنیر، خامه ترش، دوغ کره، بستنی، پودر شیر، نوشیدنی های بر پایه آب پنیر، نوشیدنی های بر پایه شیرهای تخمیری، شیر شیرین شده، شیر تغلیظ شده، شیرهای طعم دار، شیرهای غیرتخمیری و دسرهای لبنی اشاره کرد. امروزه، تولید و مصرف انواع فرآورده های غیرلبنی پروبیوتیک همچون محصولات غلات و قنادی، انواع نوشیدنی ها بر پایه آب میوه ها، آب سبزی ها و شیر سویا، غذای کودک، فرآورده های گوشتی و تنقلات سلامت‌بخش (healthy snacks) نیز به طور روزافزون مورد توجه قرار گرفته اند. در خصوص گسترش تولید و مصرف فرآورده های غذایی پروبیوتیک و سهم آن ها در تجارت مواد غذایی، اشاره به این موضوع که در بازارهای کشور ژاپن فقط بیش از پنجاه فرآورده لبنی پروبویتیک عرضه می شود و در اروپا برخی از کارخانجات فقط به منظور تولید فرآورده های پروبیوتیک طراحی و راه اندازی شده اند، کافی به نظر می رسد.

3. میارهای اساسی در گزینش پروبیوتیک ها

میکروارگانیسم های پروبیوتیک باید بیماریزا و مسمومیت زا نباشند (ایمن بودن)، اثرات سومند آن ها در ارتباط با سلامت موجودات زنده در شرایط برون- زیست (in vitro) یا درون- زیست حیوانی یا انسانی (روش اخیر، ترجیح دارد) به اثبات رسیده باشد، ترجیحا از اعضای فلور طبیعی بدن انسان باشند، به pH پایین معده، نمک های صفراوی، آنزیم های هضم کننده بزاق و روده، پادزیست ها و باکتریوفاژها تا حد امکان مقاوم باشند، قابلیت چسبندگی بالا به سلول های اپیتلیال روده داشته باشند، قابلیت تکثیر سریع و کلنی سازی بالا در روده داشته باشند، از فعالیت ضدمیکروبی مطلوب در خصوص میکروارگانیسم های مضر برخوردار باشند، ژن های مقاوم به پادزیست انتقال پذیر به میکروایگانیسم های مضر را نداشته باشند و دارای خواص فن آوری مطلوب در تولید فرآورده های غذایی (قابلیت زیستی و خواص حسی) باشند. لازم به اشاره است که پروبیوتیک ها ممکن است در افراد خاص (همچون نوزادان، افراد بسیار سالخورده و اشخاص مبتلا به بیماری های عفونی حاد و خاص) به توسعه بیماری و عفونت منجر شود. در این صورت، اخطار به عدم مصرف غذاهای حاوی این ارگانیسم ها برای گروه های خاص باید روی نشانه گذاری آن ها درج شود.

4. مهمترین میکروارگانیسم های پروبیوتیک

پروبیوتیک ها را می توان به دو دسته پروبیوتیک های عمومی و شرایطی تقسیم کرد. دسته اول در تمامی شرایط، پروبیوتیک به شمار می آیند، حال آنکه دسته دوم فقط در شرایط ویژه (برای مثال، در حیوانات خاص و در حضور باکتری های مضر خاص) از خاصیت پروبویتیک برخوردارند. از دسته اول می توان به باکتری های اسید لاکتیک جنس *لاکتوباسیلوس* (همچون *ل. اسیدوفیلوس*، *ل. کازیی*، *ل. پاراکازیی*، *ل. پلانتاروم* و *ل. رامنوسوس*)، جنس *بیفیدوباکتریوم* (*ب. بیفیدوم*، *ب. لانگوم*، *ب. اینفنتیس* و *ب. انیمالیس لاکتیس*)، جنس *پروپیونی‌باکتریوم* و مخمر *ساکارومایسس بولاردی‌یی* و از دسته دوم به *آنتروکوکوس فیسیوم*، جنس *اسپورولاکتوباسیلوس*، گونه هایی از جنس *باسیلوس* و *کلوستریدیوم*، و *اشریشیا کلای* غیربیماریزا اشاره کرد.

5. خواص سلامت‌بخش پروبیوتیک ها

خواص سلامت‌بخش پروبویتیک ها به دو دسته خواص سلامت‌بخش عمومی و اختصاصی قابل تقسیم است. مطابق با نظر قریب به اتفاق منابع و مراجع علمی و قانونی و مطابق با استاندارد ملی ایران (11325)، خواص سلامت‌بخش شامل "ضدسرطانی، بهبود سلامت و کارآیی سیستم گوارشی، تنظیم و تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول، کاهش عوارض عدم تحمل لاکتوز و افزایش ارزش تغذیه ای غذا" به عنوان خواص عمومی دانسته می شوند، بدین معنا که دارای اثراتی کلی و عمومی بوده و اثرات آن ها به اندازه داروها زودبروز، موثر و مشخص نیست. در مقابل، فرآورده های پروبیوتیک با خواص سلامت‌بخش اختصاصی، دارای اثرات درمانی قوی تر، زودبروزتر و اختصاصی تر هستند. برای مثال، در حال حاضر، ماست‌های گوناگون به منظور درمان عفونت‌های روده‌ای به‌ویژه اسهال و عفونت‌های باکتریایی و مخمری دستگاه تناسلی، مورد تولید و مصرف دارند.

6. قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در فرآورده های پروبیوتیک و استاندارد های مربوط به آن

قابلیت زیستی (viability) پروبیوتیک ها در فرآورده های پروبیوتیک، یعنی تعداد سلول های زنده و فعال پروبیوتیک در گرم یا میلی لیتر محصول نهایی تا پایان تاریخ انقضای مصرف، ارزش اساسی این فرآورده ها به شمار می آید. اگرچه تا به حال توافق جهان‌شمول در این خصوص وجود ندارد، به طور کلی، مقدار cfu/g یا 10^6 cfu/mL به عنوان کمینه عمومی قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در فرآورده های غذایی و مقدار cfu/g یا 10^7 cfu/mL به عنوان مقدار کمینه مطلوب قابلیت زیستی پذیرفته شده است. بر مبنای استانداردهای ملی ایران (11324 و 11325)، کمینه قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در ماست و دوغ به ترتیب 10^6 cfu/g< و 10^5 cfu/g< است. علاوه بر کمینه قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در فرآورده های غذایی، توصیه بر آن است که روزانه دست کم 10^9 سلول زنده و فعال پروبیوتیک از راه غذا وارد بدن شود. برای مثال، مصرف 100 mL ماست دارای قابلیت زیستی 10^7 cfu/g برآورنده این میزان است. ژاپن از جمله کشورهایی است که دارای سخت گیرانه ترین استانداردها در خصوص فرآورده های فراسودمند از جمله پروبیوتیک ها است.

مطابق با استانداردها ملی ایران (11324 و 11325)، علاوه بر نشانه های درج شده عمومی، ذکر اطلاعات و عبارات زیر نیز بر نشانه گذاری ماست و دوغ پروبیوتیک الزامی است:

– عبارات «با خواص سلامت‌بخش عمومی» یا «با خواس سلامت‌بخش اختصاصی».

– ادعا/ ادعاهای سلامت بخش عمومی با ذکر عینی کلیشه– عبارت «خواص سلامت بخش عمومی: بهبود سلامت و کارآیی سیستم گوارشی، تنظیم و تقویت سیستم ایمنی، کاهش کلسترول، کاهش عوارض عدم تحمل لاکتوز، افزایش ارزش تغذیه ای غذا». ارائه هرگونه ادعای سلامت بخش دیگر به جز عناوین یادشده، فرآورده پروبیوتیک را مشمول خواص سلامت بخش اختصاصی می کند و بدون کسب مجوز از مراجع قانونی و ذی صلاح کشور (در حال حاضر، وزارت بهداشت، درمن و آموزش پزشکی) ممنوع است. درصورتیکه چربی فرآورده بیشتر از 1/5٪ باشد، استفاده از عنوان «کاهش کلسترول» در ارتباط با خواص سلامت‌بخش عمومی مجاز نیست.

– درصد چربی و نمک (در صورت وجود)

– نوع میکروارگانیسم‌های مورد استفاده (ضرورتا، جنس و گونه)، از جمله میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک. در صورت استفاده از باکتری های سنتی ماست، ذکر عبارت «باکتری‌های ماست» و در صورت استفاده از یکی از آن‌ها، ذکر نام آن در ترکیب کشت میکروبی ضروری است. نام میکروارگانیسم‌های مورداستفاده در خصوص محصولات تولیدشده برای مصرف داخلی باید به زبان فارسی نوشته شود.

– تاریخ های تولید و انقضای قابلیت مصرف به «روز و ماه و سال»، به طور واضح و خوانا. لازم به تاکید است که اعلام تاریخ انقضای مصرف به صورت «مدت‌زمان مشخصی از روز/ هفته/ ماه پس از تولید» (برای مثال «دو هفته یا ده روز پس از تولید») مجاز نیست.

– شرایط نگه داری محصول بسته بندی شده پس از صدور از کارخانه و ذکر عبارات «تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شود».

تاکید می شود که بسته های ماست و دوغ پروبیوتیک باید در محدوده– دمای 4–5°C نگهداری شده و با وسایل نقلیه سردخانه دار، سرپوشیده و مناسب حمل شود. تولیدکننده می تواند کمینه قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها را با ذکر عبارت «حداقل تعداد سلول های زنده و فعال پروبیوتیک در هر میلی لیتر (یا در هر گرم) از فرآورده» مشخص کند. این حد شمارش باید تا پایان اتمام تاریخ انقضای مصرف حفظ شود. همچنین، تولیدکننده می تواند مقدار مصرف توصیه‌شده ماست پروبیوتیک برای برخورداری از خواص سلامت‌بخش ادعاشده را به صورت گرم/ میلی‌لیتر در روز/ هفته ذکر کند. یادآوری می شود چنانچه مصرف فرآورده های پروبیوتیک به اندازه ای مشخص ممکن است دربردارده اثرات احتمالی مضر برای قشر خاصی از مصرف کنندگان باشد، ذکر عبارت هشداردهنده مناسب ضروری است. این اثرات باید به‌وسیله سازمان غذا و دارو (FDA) یا مراجع قانونی و ذی‌صلاح کشور تایید شده باشند.

7. محدودیت های تولید و سنجش کیفی فرآورده های پروبیوتیک

تولید فرآورده های پروبیوتیک با دو مشکل از دست رفتن قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در فرآورده و احتمال رضایت بخش نبودن خواص حسی محصول نهایی همراه است. قابلیت زیستی پروبیوتیک ها به ویژه در فرآورده های تخمیری، طی تخمیر و در طول نگهداری یخچالی از دست می رود و ممکن است به کمتر از حد استاندارد برسد. احتمال مطلوب نبودن خواص حسی فرآورده های پروبیوتیک به دلیل قابلیت ضعیف پروبیوتیک ها در طعم سازی و بافت سازی و همچنین احتمال تولید برخی متابلیت های نامناسب نظیر اسید استیک در فرآورده است. عوامل گوناگون همچون pH، اسیدیته قابل‌تیتر، اکسیژن محلول، پتانسیل احیا، پراکسید هیدروژن، باکتریوسین ها، اسیدهای چرب کوتاه–زنجیر، ترکیبات رایحه دار، رقابت های میکروبی میان باکتری های آغازگر، مواد بسته بندی و شرایط بسته بندی، حجم تلقیح و نسبت تلقیح میان آغازگرها، انجام تخمیر مرحله ای (در خصوص باکتری های پروبیوتیک و باکتری های ماست سنتی)، ریز– پوشینه کردن (microencapsulation)، مقدار ماده خشک بدون چربی و درصد چربی، افزودنی های ضد میکروبی (طبیعی یا افزودنی)، مقدار شکر، شیرین کننده ها و نمک، مکمل سازی محیط با ترکیبات مغذی، فشار اسمزی، درصد رطوبت و فعالیت آبی، فرآیند گرمایی محیط پیش از تخمیر، دمای گرمخانه گذاری، دمای نگهداری یخچالی، کربناته کردن، سرعت سردکردن فرآورده پس از تخمیر،

حجم تولید، شرایط انجماد (سرعت و دما) ذوب فرآورده های منجمد، وجود آلودگی های ثانویه در محصول و تنش های مکانیکی به سلول ها طی فرآیند، قابلیت زیستی پروبیوتیک ها در فرآورده های مربوط و خواص حسی آن ها را تحت تاثیر قرار می دهند. بنابراین، از دیدگاه فن آوری مواد غذایی، فرآورده پروبیوتیک با کیفیت مطلوب فرآورده ای است که از قابلیت زیستی تا حد ممکن بالای پروبیوتیک ها تا تاریخ پایان انقضای مصرف ضمن دارا بودن خواص حسی رضایت بخش برخوردار باشد.

سنجش قابلیت زیستی پروبیوتیک ها از دیگر محدودیت های مرتبط با فرآورده های پروبیوتیک است. روش پلیت گذاری (plating methodology) به علت دارا بودن مزایایی همچون ساده بودن ا نجام، کم هزینه بودن، در دسترس بودن محیط های کشت و تخصیص یافتگی نسبتا بالا، مرسوم ترین شیوه شنا سایی و شمارش میکرواگانیسم های پروبیوتیک است. با این وجود، زمان بر بودن، دشواری در افتراق و شمارش در ارتباط با کشت های مخلوط پیچیده، امکان پیدایش کلنی های نامشخص (atypical) و تداخل های سویه ای، تفاوت در ویژگی های کلنی شناختی و قابلیت بازیابی کلنی (colony recovery rate/colony forming ability) یک سویه در محیط های کشت گوناگون و در یک محیط با شرایط گوناگون (از نظر نوع و غلظت افزودنی ها در محیط، فشار اکسیژن، رقت سلول ها در سوسپانسیون در حال کشت و جز این ها)، امکان ایجاد کلنی های متفاوت (از نظر ظاهر و تعداد) سویه های مختلف یک گونه در محیط کشت واحد و امکان ایجاد کلنی های ظاهرا یکسان دو گونه از نقایص این روش به شمار می آید. همچنین، روش شمارش محیط کشتی به میکروارگانیسم های قابل کشت و قابل رویش در/ بر این محیط ها محدود می شود. در خصوص شمارش اختصاصی پروبیوتیک ها، دشواری اصلی در کشت های مخلوط به ویژه در انواع با بیش از دو گونه پروبیوتیک و دارای کشت های مکمل/کمکی/حامی (support-/adjunct-/supplement-/co-culture) است. روش های مولکولی (ژنوتیپی) به رغم دقت و کارآیی بالا، دارای محدودیت های قابلیت روزمره–کاری (routinization) پایین، هزینه نسبتا بالا و نیاز به تخصص بالا است. روش های شمارش کشت های مرسوم پروبیوتیک در ماست از راه پلیت گذاری در استاندارد ملی ایران (11325) مورد اشاره قرار گرفته است.

8. پژوهش های آینده در خصوص پروبیوتیک ها

پژوهش های آینده در ارتباط با فن آوری پروبیوتیک ها به جوانبی همچون شناخت بیشتر ماهیتی، سازوکاری و زیست–شیمیایی انواع پروبیوتیک ها، روش های جدید (فرمول بندی و فرآیند) در بهبود قابلیت زیستی این باکتری ها و خواص حسی فرآورده نهایی، طراحی فرآورده های جدید پروبیوتیک به ویژه انواع آمیزه ای با چند گروه مواد غذایی، گزینش سویه های مناسب بومی از منابع گوناگون و سازگار کردن بیشتر آن ها به محیط انواع فرآرده های غذایی، تولید محصولات غذایی پروبیوتیک با انواع خواص سلامت بخش اختصاصی و بهبود و توسعه روش های سنجش قابلیت زیستی پربیوتیک ها مربوط خواهد بود.

The evaluation of probiotic effect of Lactobacillus casei on the Tumor growth rate in BALB/c mice bearing breast cancer

Yazdi, M.H [1]. Soltan Dallal, M.M [1*]. Hassan, Z.M [2]. Holakuyee, M [3], Abedi Mohtasab,

T.P[1], Agha Amiri S[1], Mahdavi,M [2].

Department of pathobiology, faculty of public health, Tehran university of medical science

Department of immunology,school of medical science Tarbiat modares university Tehran, Iran

Molecular Immunology Lab, Pastur Institute of Iran

Corresponding author: Soltan Dallal MM, soltanda@sina.tums.ac.ir

Abstract

Background and Aims: Antitumor effect of lactic acid bacteria (LAB) have been shown in many studies, this effect maybe as a result of immunomodulatory properties of these bacteria. In present work we have studied the effect of *Lactobacillus casei* on the tumour growth rate in BALB/c mices bearing breast cancer.

Methods: 6-8 week-old In-bred BALB/c mice, each weighing 25–30 g, were used. There are tow experimental group consisted of 9 mices and 9 mices were used as controls in each assay. The *L.casei* ATCC39392 strain used in this study was inoculated in MRS broth and cultivated for a day at 37 °C under anaerobic conditions, collected by centrifugation and resuspend in PBS. After preparation of proper amount of these suspension it was orally administered to the mice with a gastric feeding, Control mice received an equal volume of PBS in duration of study.

Results: results of present work showed that oral administration of *L.casei* can inhibit the tumour growth and increased the local inflammation in DTH assay as a result of increase in immune responses efficiency.

Conclusion: In conclusion oral administration of *Lactobacillus casei* may regulate immune responses skewed Th1 balance and maybe helpful for cancer immunotherapy, but further studies is needed to investigate the other mechanisms of this effect.

Keywords: probiotic, Lactobacillus casei, Tumor growth, Breast cancer

روشهای مولکولی شناسایی پروبیوتیکها

دکتر محمد حسن شاه حسینی ،دانشیار گروه میکروبشناسی – دانشگاه آزاد اسلامی- واحد شهر قدس

چکیده: میکروفلور دستگاه گوارش تحت تاثیر عوامل باکتریایی پروبیوتیک قرار دارند. پیشرفتهای روشهای مولکولی در سنوات اخیر، امکانات زیادی جهت مطالعه و شناسایی میکروبهای روده ای، که نوعا در روشهای متواتر به سختی مطالعه می گردند را فراهم نموده است. میکروفلور روده ای عمدتا از باکتریهای بیهوازی خصوصا پرنیازی تشکیل شده که شناسایی آنها از طریق روشهای متواتر میکروبشناسی بسیار امری مشکل، زمان بر و پر هزینه می باشد لذا گرایشهای مولکولی اخیر، راه حلی مناسب جهت شناسایی آنها و همینطور میکروبهای غیر قابل کشت در نمونه های روده ای شده است. بنابراین ارزش روشهای مولکولی در مطالعه میکروبهای روده ای در سالهای اخیر ممتاز و غیر قابل انکار گشته است. طبق تعریف، پروبیوتیکها متمم های غذایی حاوی میکروبهای زنده هستند که دارای اثرات و منافع زیادی بر روی میزبانها به طریق بهینه نمودن بالانس میکروبی روده ای می باشند. این مواد غذایی حاوی میکروبهای مفید، دارای مزایایی مانند فعالیت آنتاگونیستی، تولید مواد ضد میکروبی، تعدیل پاسخهای ایمنی و آثار مفید بر روی فعالیتهای متابولیکی احشاء هستند. باکتریهای پروبیوتیک به نظر می رسد در آینده نقش مهمی جهت درمان ناراحتیهای روده ای معده ای ایفا نمایند لذا مطالعات بیشتر جهت بدست آوردن اطلاعات اساسی و پایه ای راجع به این باکتریهای مهم بایستی انجام شود. بعلاوه، هیچکدام از سویه های مورد استفاده به تنهایی دارای منافع فوق الذکر در بالا نیستند و لذا فعالیتهای غربالگری جهت شناسایی سویه های جدید امری لازم و ضروری است. هنوز ابهامات زیادی راجع به مکانیسم فعالیت میکروبهای دستگاه گوارش و پروبیوتیکهای پیشنهادی وجود دارد لذا جهت بدست آوردن اطلاعات بیشتر به لحاظ مکانیسم عمل این دو، روشهای تعیین هویت مولکولی میکروبیوتا و پروبیوتیکها مد نظر است. روشهای سریع، قوی و منعطف مولکولی جهت شناسایی و بدست آوردن تصویری کلی از تغییرات میکروبیوتا در دستگاه گوارش و همینطور تکنیکهایی با قابلیت بالا، جهت دنبال کردن گونه ها و سویه های انتخابی مورد نیاز می باشد. در سالهای اخیر روشهای مولکولی متعددی جهت اهداف فوق الذکر توسعه یافته است. از مهمترین این روشهای مولکولی جدید می توان به 1) روشهای تکثیر اسید نوکلئیک در

شرایط آزمایشگاه، مانند PCR و مشتقات آن ، PCR-RFLP ، PCR-Hybridization ، PCR-PCR ، PCR-SSCP ، PCR-DGGE ، PCR-TGGE ، 2) تکنیکهای تکثیر هم دما همچون NASBA ، TMA و LAMP 3) روشهای هیبریدیزاسیون مانند FISH 4) تکنیکهای ریبل تایم 5) ریزآرایه های DNA و تراشه های ژنی و یک دوجین روشهای مولکولی دیگر اشاره نمود. این روشهای نوین مولکولی کاندید خوبی جهت کاربرد در زمینه میکروبهای روده ای و پروبیوتیکها هستند.

لغات کلیدی: پروبیوتیک، شناسایی مولکولی، تکثیر اسید نوکلیئک

Molecular methods for detection of probiotics

Shahhosseiny MH.

Microbiology department, Islamic Azad University, Qods Branch,

Shahhosseiny@yahoo.com

Abstract: Gastrointestinal (GI) microbiota can be influenced by probiotic bacteria. Molecular methods have facilitated culture-independent studies of gastrointestinal tract microbes. The GI microbiota is mainly composed of fastidious anaerobic organisms and moreover, direct molecular approaches have confirmed the abundance of uncultivable microbes in intestinal samples. The value of molecular methods for studying GI tract microbes is therefore immense.

The probiotics, defined as “live microbial food supplements which beneficially affect the host by improving the intestinal microbial balance, have been proposed to possess several advantageous properties, such as antagonistic actions, production of antimicrobial substances, modulation of immune responses and an impact on the metabolic activities of the gut. Probiotic bacteria seem to hold great promise for treatment of gastrointestinal disorders, yet further studies are required to create a more scientific basis for the probiotic action. Furthermore, as no single strain is likely to have all the aforementioned beneficial properties, screening of new strains for probiotic potential is necessary.

Since, the mechanisms of action of both the GI microbes and the proposed probiotics remain obscure. To gain more information, molecular identification methods for members of the GI microbiota and the probiotic strains are needed. Quick, robust methods are necessary for obtaining an overall image of changes in GI microbiota, and more sophisticated methods are needed for following up selected species or strains.

In recent years, multiple molecular methods developed for detection of GI and probiotics. Most important molecular methods for these approach are: 1) In-vitro nucleic acid amplification techniques for example, PCR and derivatives (PCR-RFLP, PCR-Hybridization, PCR & PCR, PCR-SSCP, PCR-DGGE, PCR-TGGE, 2) Isothermal amplification methods, (Nucleic Acid Sequence Based Amplification-NASBA, Transcription Mediated Amplification-TMA, and Loop mediated isothermal AMPlification-LAMP) , 3) Hybridization methods (Fluorescence In Situ Hybridization-FISH), 4) Real Time PCR, 5) DNA Microarray and Genechip and a dozen molecular methods progressed. Novel molecular methods are candidates for GI and probiotic application.

Keywords: Probiotic, molecular detection, Nucleic acid amplification

هر گاه نام میکروبها بیان می شود به غلط اذهان به دنبال ارگانیسمهایی می گردد که دست خلقت آنها را برای بیمار کردن نوع انسان خلق نموده است این یک باور غلط است چرا که امروزه می دانیم در ساخت داروها، هورمون ها، واکسن ها، آنزیم ها و... از میکروارگانیسم ها به عنوان یک جزء اصلی در فرآیند تولید استفاده می شود.

پیشینه استفاده از پروبیوتیک‌ها به زمانی برمی گردد که یک پزشک روسی به نام "متچنیکف" فهمید که خوردن یک نوع ماست تخمیر شده از شیر، سبب طول عمر و حفظ سلامت روستاییان بلغاری شده است. اصطلاح پروبیوتیک که ریشه لاتین دارد، به معنی "برای زندگی " است و سازمان جهانی بهداشت، این اصطلاح را به "ارگانیسم‌های زنده‌ای "اطلاق می‌کند که در صورت مصرف به میزان لازم، اثرات "سلامت‌زایی" موثری برای میزبان خود دارند. فولر در سال 1985، پروبیوتیک را به صورت جدیدی تعریف کرد: "پروبیوتیک مکمل غذایی متشکل از میکروب های زنده است که مصرف آن به دلیل تغییر مطلوب در توازن میکروبی روده اثرات مفیدی در فرد می گذارد." پروبیوتیک، به‌عنوان صفت مواد غذایی حاوی این باکتری‌ها هم به‌کار می‌رود. فرآورده‌های پروبیوتیکی حاوی باکتری‌های مفیدی هستند که پس از مصرف در روده ساکن می‌شوند و اثرات مفیدی در سلامتی انسان برجای می‌گذارند. پروبیوتیک‌های رایج، شامل گونه‌های مختلف باکتری‌های بیفیدو باکتریوم، لاکتوباسیلوس و همچنین بعضی گونه‌های مخمر هستند.

چندین و چند سال است که معلوم شده فقدان باکتری‌ها در روده به سلامت آسیب می‌رساند؛ مثلا حیوانات آزمایشگاهی که در شرایط بدون باکتری و استریل رشد پیدا می‌کنند، اکثرا سیستم ایمنی تکامل نیافته و روده‌ای آسیب پذیر دارند. همین مساله می‌تواند برای نوزاد انسان هم مصداق داشته باشد و نوزاد را نسبت به ابتلا به انواع آلرژی‌ها و عفونت‌های تهدیدکننده زندگی مستعد کند. حتی معلوم شده یکی از بیماری‌هایی که پروبیوتیک‌ها با آن مقابله می‌کنند، اگزما در نوزادان است. محققان فنلاندی، پروبیوتیک لاکتوباسیلوس را برای مادران حامله و نوزادان متولد شده که احتمال ابتلا به حساسیت داشتند، به مدت شش ماه، تجویز کردند. هنگامی که بچه‌ها دو ساله شده بودند، پروبیوتیک، احتمال بروز اگزما را تا نصف کاهش داده بود. درواقع می‌شود گفت پروبیوتیک‌ها، سیستم ایمنی بدن را تمرین می‌دهند تا در برابر باکتری‌های بیماری‌زا هم از خودش واکنش خوبی نشان دهد. به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها قادرند جذب مواد آلرژی‌زای لبنیات را از طریق روده‌ها کاهش دهند وخود مواد آلرژی زا را هم در روده از بین ببرند. پروبیوتیک‌ها علاوه بر این قادرند عفونت باکتریایی واژن را که یکی از علل سقط زودهنگام است، از بین ببرند. عفونت باکتریایی واژن که اغلب بدون علامت است یا با عفونت قارچی اشتباه می‌شود، می‌تواند غشای اطراف جنین را تخریب کند و باعث زایمان زودرس شود.

فرآورده‌های پروبیوتیک دارای ویژگی های خاصی هستند که عبارت است از : 1) میکروارگانیسم های آن در دسته پروبیوتیک ها طبقه بندی شده باشند؛ یعنی جزء فلورمیکروبی طبیعی روده انسان باشند. 2) به صورت زنده و فعال و به تعداد کافی به روده برسند. 3) نسبت به اسید معده و نمک های صفراوی در روده کوچک مقاوم باشند. 4) توانایی اتصال به سلول های اپیتلیال روده را در رقابت یا پاتوژن ها داشته باشند. 5) توانایی تولید ترکیبات ضد باکتری های مضر مثل تولید اسید لاکتیک، باکتریوسین و غیره را داشته باشند.

مصرف غذاهای پروبیوتیک اثرات مفید زیادی برای سلامتی فرد دارند. چند اثر مهم این دسته از محصولات عبارت است از: 1. جلوگیری از رشد و فعالیت باکتری های پاتوژن، 2. کاهش کلسترول خون، 3. بهبود هضم لاکتوز در روده، 4. جلوگیری و کاهش بیماری های روده ای و سرطان، 5. تقویت سیستم دفاعی و ایمنی بدن، 6. تولید ریزمغذی ها، 7. افزایش دسترسی بیولوژیک به یون ها، 8. بهبود عملکرد دستگاه گوارشی و حرکات دودی روده، 9. تولید اسید لاکتیک مورد نیاز بدن، 10. افزایش ماندگاری محصولات غذایی، 11. تولید آنتی اکسیدان ها و ترکیبات ضد سرطان، 12. کاهش پوکی استخوان، 13. کاهش فشار خون، 14. کاهش شیوع و تداوم اسهال، 15. کاهش ابتلا به عفونت های تناسلی در زنان. همچنین در صورتی که با داروهای مناسب مصرف شود، به مداوای زخم معده و اثنی عشر کمک می کند.

بیشترین تحقیقات در ایران روی فرآورده های لبنی و ماست انجام شده و پژوهشگران موفق شده‌اند با افزودن برخی مکمل‌های لبنی، ویژگی‌های نامطلوب ماست پروبیوتیکی را بهبود بخشند.

پیشرفتهای روشهای مولکولی در سنوات اخیر، امکانات زیادی جهت مطالعه و شناسایی پروبیوتیکها، میکروبهای روده ای، و مکانیسم اثر آنها که نوعا در روشهای متواتر به سختی مطالعه می گردند را فراهم نموده است. میکروفلور روده ای عمدتا از باکتریهای بیهوازی خصوصا پرنیازی تشکیل شده که شناسایی آنها از طریق روشهای متواتر میکروبشناسی بسیار امری مشکل، زمان بر و پر هزینه می باشد لذا گرایشهای مولکولی اخیر، راه حلی مناسب جهت شناسایی آنها و همینطور میکروبهای غیر قابل کشت در نمونه های روده ای شده است. بنابراین ارزش روشهای مولکولی در مطالعه میکروبهای روده ای در سالهای اخیر ممتاز و غیر قابل انکار گشته است. لذا جهت بدست آوردن اطلاعات بیشتر به لحاظ مکانیسم عمل این دو، روشهای تعیین هویت مولکولی میکروبیوتا و پروبیوتیکها مد نظر است. روشهای سریع، قوی و منعطف مولکولی جهت شناسایی و بدست آوردن تصویری کلی از تغییرات میکروبیوتا در دستگاه گوارش و همینطور تکنیکهایی با قابلیت بالا، جهت دنبال کردن گونه ها و سویه های انتخابی مورد نیاز می باشد. در سالهای اخیر روشهای مولکولی متعددی جهت اهداف فوق الذکر توسعه یافته است. این روشهای نوین مولکولی کاندید خوبی جهت کاربرد در زمینه میکروبهای روده ای و پروبیوتیکها هستند. هدف این گفتار تشریح برخی از مهمترین تکنیکهای مولکولی مورد استفاده جهت شناسایی پروبیوتیکها و میکروفلور روده ای است.

شناسایی عوامل پروبیوتیک و روده ای

تشخیص سریع عوامل پروبیوتیک و روده ای و همینطور بررسی تغییرات آنها در شرایط مختلف، نقشی مرکزی در مطالعات این دسته از عوامل میکروبی دارد. نکات مهمی در سالیان اخیر باعث بهبود تکنیکی ، حساسیت و ویژگی روشهای نوین مورد استفاده در شناسایی عوامل میکروبی، خصوصا پروبیوتیکها و میکروارگانیسمهای روده ای گردیده است. اهم این پیشرفتها که عموما در روشهای نوین و مولکولی مورد استفاده در شناسایی اتفاق افتاده و موجب تحولی شگرف در این تکنیکها گردیده عبارتند از :

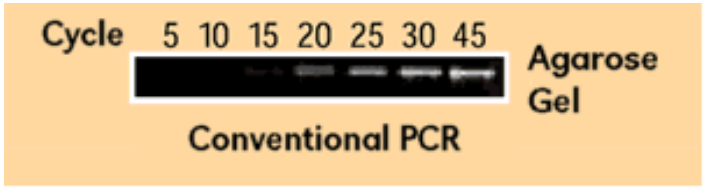
1- اختراع و کشف دستگاههای ترموسایکلر قابل برنامه ریزی

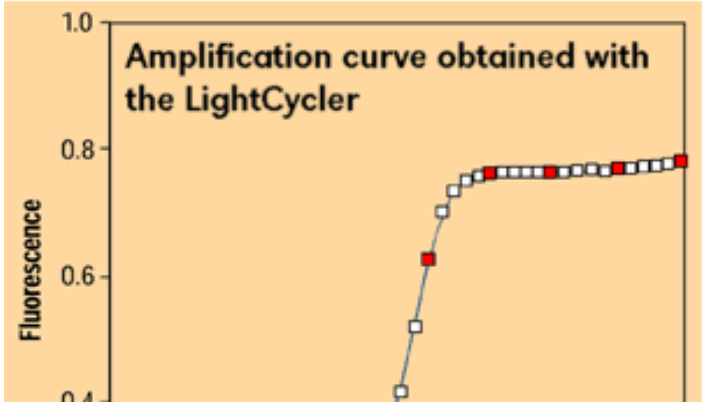
2- افزایش فاحش در دسترسی به اطلاعات ترادف ژنها
3- انواع تغییرات در پرایمرها
4- ابداع تکنیکها یا مشتقات مختلف PCR
5- مخلوط کردن روشهای هیبریدیزاسیون با آمپلیفیکاسیون

در ادامه به دلیل گسترده بودن این تحولات، صرفا به شرح مهمترین این پیشرفتها در روشهای مولکولی یعنی سیستمهای رییل تایم، و ریزآرایه ها و تراشه های ژنی پرداخته شده است.

تکنیکهای رییل تایم

تکنیک رییل تایم در واقع نقطه برخورد ابداعات جدید در زمینه ترموسایکلر ، انواع تغییرات در پرایمرها و مخلوط کردن روشهای هیبریدیزاسیون با تکنیکهای آمپلیفیکاسیون می‌باشد. در واقع نسل جدیدی از ترموسایکلرها با سیستم فلورومتری این اواخر ارائه شده که اجازه مونیتور کردن پیوسته خاصیت فلوئورسانس محصول PCR در زمان جمع شدن را می‌دهد(شکل 1). در این سیستمها از کاوشگرها یا پروبهای هیبریدیزاسیون مارک دار شده با رنگهای فلوئورسانس در انتهای 5َ یا 3َ استفاده می‌شود که امکان مونیتورینگ پیوسته محصول PCR را بدون جداسازی آنها در روشهائی همچون الکتروفورز در ژل آگاروز یا ژل پلی‌آکریل آمید ، می‌دهد. افزایش سرعت سیستمهای رییل تایم مربوط می‌شود به : 1) کاهش زمان سیکلهای PCR ، 2) حذف مرحله Post-PCR ، و 3) کاربرد مارکهای فلوروژنیک و روشهای حساس آشکارسازی تابش آنها. سازندگان و کاربران در این روش سعی می‌کنند که محصول (Amplicon) کوچکتر طراحی تا سرعت افزایش یابد، معذالک نشان داده شده است که کاهش اندازهٔ محصول لزوماً بازده PCR را بهینه نمی‌نماید. از معایب سیستمهای رییل تایم نسبت به روشهای متواتر PCR ، می‌توان اشاره نمود به : 1) عدم توانائی در مشخص کردن اندازه محصول بدون بازکردن سیستم ، 2) ناسازگار بودن برخی پلات فورمها با شیمی برخی رنگهای فلوروژنیک و 3) بطور نسبی توانائی محدود کاربرد روش مالتیپلکس.





شکل.1. مونیتور کردن محصول PCR ،

در روشهای رییل تایم، سیکل به سیکل

امکان پذیر می باشد.

در روشهای رییل تایم نیازی به دستکاریهای بعد از مرحله تکثیر آمپلیکون نمی‌باشد بنابراین ، این روشهای سنجش تحت عنوان روشهای بسته (Closed) یا سیستمهای هوموژن (Homogeneous) مشهور گردیده اند. از مزایای سیستمهای هوموژن به حداقل رسیدن آلودگی بعنوان آفت اصلی روشهای تکثیری و توانائی انجام دقیق سنجش می‌باشد.

از PCR تا Real Time PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یا PCR در سالهای اخیر بعنوان یک استاندارد طلائی جدید، جهت شناسائی طیف وسیعی از میکروارگانیسمها خصوصا عوامل پروبیوتیک و روده ای مورد استفاده واقع شده است. در روشهای سنتی PCR ، ردیابی محصول در نقطه انتهائی (End-Point) انجام می‌شود در صورتی که در روشهای رییل تایم عمل ردیابی محصول در حین انجام واکنش و به موازات پیشرفت آن ، سیکل به سیکل انجام می‌گردد. در روشهای سنتی PCR ، بررسی محصول در مرحله ایستا (Plateu) و یا در نقطه انتهائی (End-Point) و اما در روشهای Real-Time در طول فاز اولیه یا زود (Early) یا فاز رشد (Exponential) انجام می‌شود.

در سیستمهای سنتی از روش الکتروفورز در ژل آگاروز یا پلی‌آکریل‌آمید استفاده می‌شود که خیلی دقیق نمی‌باشد و End Point یک نمونه با نمونه‌های دیگر می‌تواند متفاوت باشد. به بیان دیگر ژلهایی مانند آگاروز دارای قدرت تفکیک کم از لحاظ مقدار بوده و تغییرات زیاد را نمی‌توانند نمایان کنند. در صورتی که در روشهای رییل تایم با حذف ژل و با استفاده از مارکهای فلوئورسنتی ، دقت شناسائی افزایش یافته است به نوعی که در روشهای رییل تایم، ردیابی حتی دو برابر شدن محصول امکان پذیر است در صورتی که در روشهای سنتی ، 5 برابر شدن محصول هم قابل آشکار شدن نمی‌باشد.

برخی از مشکلات آشکار شدن محصول PCR در نقطه انتهائی ، در روشهای سنتی عبارتند از : 1) دقت کم ، 2) حساسیت کم ، 3) طیف دینامیک کوتاه ، کمتر از 2 لگاریتم ، 4) قدرت تفکیک کم ، 5) اتوماتیک نشدن ، 6) افتراق فقط براساس اندازه ، 7) بیان نکردن نتایج بصورت اعداد ، 8) کمّی نبودن اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی ، و 9) وقت گیر بودن پروسهٔ تشخیص محصول بعد از تکثیر.

جهت پی بردن به معایب و محدودیتهای End Point PCR لازم است ببینیم در یک واکنش PCR چه اتفاقی می‌افتد. یک واکنش PCR را می‌توان به سه مرحله یا فاز تقسیم نمود : مرحله اول : مرحله افزایش تصاعدی (Exponential) ،که در طی آن میزان جمع شدن محصول

PCR بصورت دو برابر شدن (البته در سیکلهای اولیه) و یا بازده واکنش صد در صد می‌باشد. در این مرحله واکنش PCR خیلی ویژه و دقیق است. مرحله دوم : مرحله خطی با تغییرات بالا Linear (High-Variability) است که اجزاء واکنش تا حدی در مرحله قبل مصرف شده ، واکنش کندتر گردیده و محصولات آرام آرام شروع به تجزیه می‌کنند. میزان محصول د راین مرحله در هر سیکل دو برابر نمی‌شود. مرحله سوم : مرحله ایستا (Plateau) که محصول PCR در روشهای سنتی ، در این مرحله به روش الکتروفورز در ژل آگاروز یا پلی اکریل آمید بررسی می‌شود. در این مرحله واکنش متوقف شده محصول بیشتری تولید نمی‌شود و اگر این مرحله ادامه پیدا نماید محصولات جمع شده شروع به تجزیه می‌نمایند.

بهترین مرحله جهت بررسی آمپلیکون ، مرحله اول یا افزایش تصاعدی است که در طی آن میزان جمع شدن محصول PCR ، بصورت دو برابر شدن با بازده واکنش صددرصد می‌باشد. در روشهای Real Time ، این مرحله مورد هدف و بررسی قرار می‌گیرد.

شیمی رییل تایم

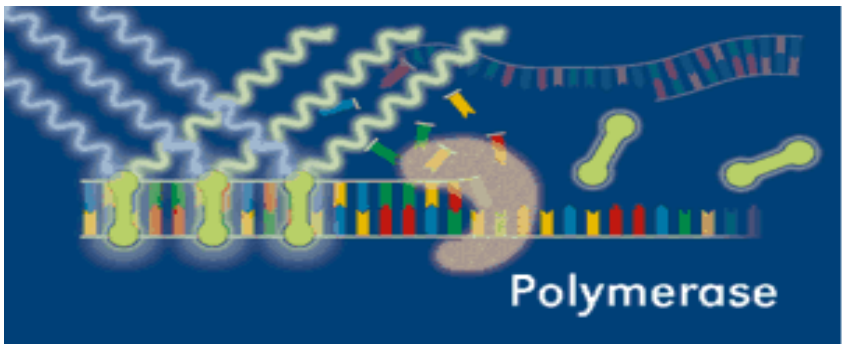
مکانیسم شیمیائی سیستمهای رییل تایم به 4 نوع اصلی قابل تقسیم بندی است : الف) رنگهائی که در DNA دو رشته‌ای داخل شده و خاصیت فلوئورسنس دارند. ب) پروبهای مارک دار شده از دو طرف (Dual-Labeled probes=5′ Nuclease Oligoprobe) پ) سیستم پروب بر پایه انتقال انرژی فلوئورسانس (FRET Probe System) ت) پروبهای علامت مولکولی (Molecular beacon probes) و آمپلیکون خود فلوئورسینگ (Self – Fluorescing amplicon) .

فلوروفورهای متصل شونده به DNA

اساس این روش بر مبنای چسبیدن رنگهای فلوروفور به سکانس DNA دو رشته‌ای در واکنش PCR می‌باشد. ساده ترین روش رییل تایم، برمبنای چسبیدن رنگهای متصل شونده و فلورفور به DNA ، مانند اتیدیوم بروماید ، Yo-PRO-1 ، سایبرگرین یک می‌باشد. این رنگها بعد از چسبیدن به DNA و در معرض قرار گرفتن نسبت به یک طول موج نوری خاص ، دارای خاصیت فلوئورسانس می‌شوند. مشخصاً کاربرد این تکنیک مستلزم هزینه ، دانش و مهارت کمتری نسبت به استفاده و طراحی الیگوپروبهای فلوروژنیک می‌باشد(شکل 2).

وقتی اتیدیوم بروماید یا سایبرگرین یک به dsDNA متصل شود و در معرض نور ماوراء بنفش قرار گیرد منتج به ایجاد خاصیت فلوئورسانس می‌شود. هر چه مقدار DNA دو رشته‌ای بیشتر شود میزان چسبیدن اتیدیوم بروماید یا سایبرگرین یک به DNA بیشتر و خاصیت فلوئورسانس هم بالطبع بیشتر می‌گردد. وارد شدن این رنگهای فلوروفور در درون dsDNA ، ممانعتی از تکثیر آن نمی‌نماید. اما متأسفانه رنگهای فلوروفور به هر DNA دو رشته‌ای در درون واکنش PCR ، مانند دایمرهای پرایمری ، محصولات تکثیری ناخواسته و غلط متصل می‌شوند یعنی در این روش فرقی بین آمپلیکون صحیح و غلط گذاشته نمی‌شود لذا در این روش واکنش باید به گونه‌ای اپتیمم و بهینه گردیده باشد تا تنها محصول صحیح تکثیر گردد.

شکل دایمرپرایمری را می‌توان با استفاده از نرم افزارهای توانا در تجربه و تحلیل منحنی ذوب فلوئورسنت، تا حد زیادی برطرف نمود. این روش برمبنای اختلاف دمای ذوب (TM) دایمرهای پرایمری با محصول PCR می‌باشد. آنالیز منحنی ذوب آمپلیکون در حضور رنگ سایبرگرین نشان داده شده است که حساسیت عملی فلوروفورهای متصل شونده به DNA بوسیله تکثیر غیر اختصاصی در غلظت پایین الگو، محدود می‌گردد.



شکل.2. فلوروفورهای متصل شونده به DNA

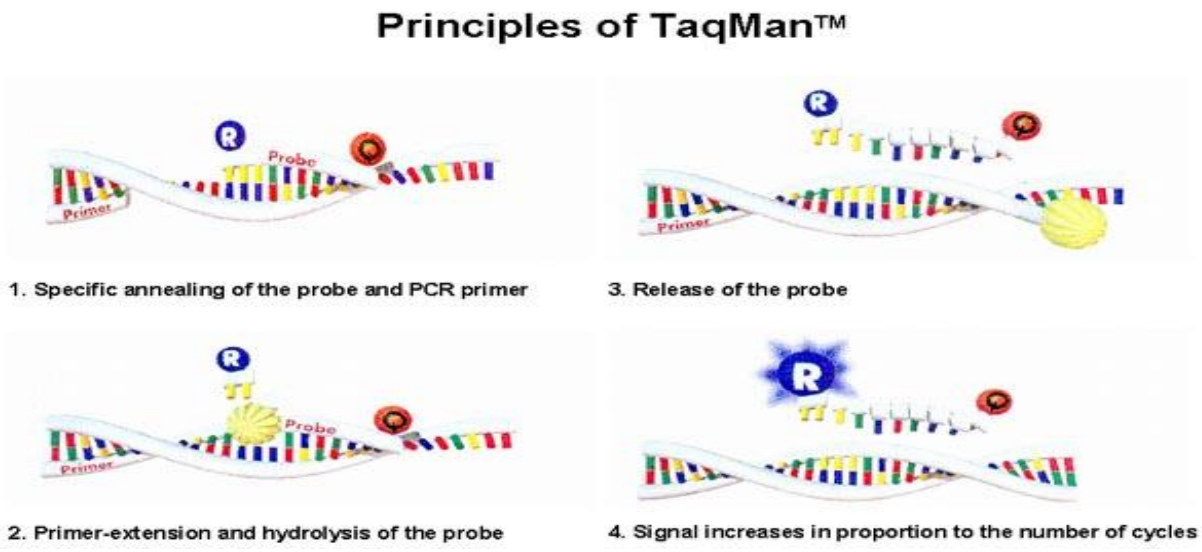
پروبهای مارک دار شده از دو طرف

در سالهای اخیر روشهایی جهت شناسائی اختصاصی محصول صحیح، طراحی و به مرحله تولید رسیده است. دو فرمت بطور معمول در این ارتباط استفاده می‌شود که عبارتند از : 1) نشر خاصیت فلوئورسانس بوسیله رنگ گزارشگر آزاد شده از قسمت 5َ کاوشگر در اثر خاصیت اگزونوکلئازی پنج به سه آنزیم Taq DNA Polymerase که در عین حال یک بخش quencher را حمل می‌کند. 2) نشر خاصیت فلوئورسانس بوسیله نزدیک شدن دو رنگ به هم در مجاورت یکدیگر یا سیستم FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

در روش اول (پروبهای مارک دار شده از دو طرف یا سیستم 5′ Nuclease oligoprobe) از کاوشگری استفاده می‌شودکه برای هدف یا محصول PCR صحیح طراحی گردیده و در بخش 5َ با یک مولکول گزارشگر فلوئورسانس، و در انتهای 3َ بوسیله یک کوانچر مارک دار گردیده است. تا زمانی که این کاوشگر بدین صورت است خاصیت فلوئورسنس مولکول گزارشگر مجال بروز بواسطه مولکول کوانچر ندارد. در این روش ابتدا DNA دو رشته‌ای هدف در مرحله دناتوراسیون، تک رشته‌ای می‌گردد و سپس کاوشگر به قسمت تقریباً مرکزی مولکول هدف و قسمت مورد تکثیر می‌چسبد. در این مرحله پرایمر هم به سکانس مکمل خود چسبیده و شروع به عمل پلیمریزاسیون با استفاده از آنزیم Taq DNA Polymerase می‌نماید. آنزیم Taq دارای خاصیت اگزوئوکلئازی پنج به سه است. لذا در حین سنتز رشته جدید

از انتهای 5 شروع به برداشتن کاوشگر مخصوص می‌نماید. فعالیت اگزونوکلئازی ´5 به ´3 آنزیم Taq موجب جدا شدن مارک ´5 (یعنی رنگ فلوئورسانس گزارشگر) از انتهای مولکول کاوشگر شده و بنابراین خاصیت فلوئورسانس مولکول گزارشگر در این مرحله بیان می‌گردد. این خاصیت برمی‌گردد به میزان محصول اختصاصی، یعنی در هر سیکل اگر محصول اختصاصی مرحله به مرحله افزوده گردد به تبع آن میزان چسبیدن مولکول کاوشگر ویژه هم بیشتر شده و نهایتاً میزان فلوئورسانس هم بیشتر می‌گردد(شکل3)

شکل.3. پروبهای مارکدار شده از دو طرف



دستگاههای زیادی جهت شناسائی این خاصیت فلوئورسانس و اندازه گیری همزمان آن در حین سیکلهای PCR طراحی گردیده است. این سیستمها قادر به شناسائی چندین رنگ فلوئورسانس بطور همزمان بوده که نتیجتاً امکان انجام تجزیه و تحلیل چندین PCR و استفاده از کنترلهای داخلی را می‌دهد. رنگهای فلوئورسانسی که جهت مارک دار کردن پروبهای داخلی استفاده می‌شوند شامل 6- کربوکسی فلوئورسین (FAM)، 7،4،2،7´،4´،5´،7 هگزاکلرو 6- کربوکسی فلوئورسین (TET) می‌باشد و کوانچرها عموماً رودامین یا TAMRA است. سیستم شناسائی سکانس ABI PRISM 7700 اولین سیستم Real Time بود که برای اولین بار در سال 1996 توسط کمپانی Applied Biosystems معرفی شد. این سیستم در واقع مخلوطی از ترموسایکلر، لیزر، سیستم شناسائی اسپکتروفلورومتریک و نرم افزاری است که برای کاوشگرهای TaqMAN طراحی گردید. لیزر گاز آرگون این سیستم، نور آبی رنگ در طول موج 488 نانومتر، برای تحریک رنگ گزارشگر فلوئورسانس تولید می‌نماید. سیستم 7700، خاصیت فلوئورسانس بین طول موجهای 660-500 نانومتر را در هر 96 نمونه موجود در چاهکها به ترتیب بررسی می‌نماید.

معیارهای مطلوب یک مارک الیگوپروب عبارت است از: 1) اتصال آسان مارک به DNA 2) قابل آشکار شدن با وسائل ساده 4) تولید سیگنال تغییر یافته در هنگام هیبریدیزاسیون 5) ایمنی از لحاظ بیولوژیک 6) پایدار در دماهای بالا.

خصوصیات الیگوپروبهای TaqMan عبارت است از : 1) طول 40–20 نوکلئوتید 2) محتوای GC حدود 60–40 درصد 3) نداشتن موتیفهای تکراری 4) هیبرید نشدن با پرایمرهای جلوئی و عقبی 5) TM حداقل کمتر از 5 درجه سانتیگراد بالاتر از پرایمرها، جهت چسبیدن الیگوپروبها به الگو قبل از اینکه مرحله Extension توسط پرایمرها اتفاق افتاد.

سیستم پروب بر پایه انتقال انرژی فلوئورسانس FRET Probe System

کاربرد یک جفت الیگوپروبهای هیبریدیزاسیون فلوروژنیک نزدیک بهم، اولین بار در اواخر 1980 میلادی شرح داده شد و برای اولین بار در دهه 90 میلادی در تکنولوژی لایت سایکلر (Lightcycler) توسط کمپانی Roche پیاده گردید. این تکنولوژی تحت نام Hybprobes هم مشهور می‌باشد. در سیستم FRET یا انتقال انرژی فلوئورسانس، دو رنگ یا دو کاوشگر حاوی دو رنگ فلوروفور مورد استفاده واقع می‌شوند. این دو رنگ اگر در مجاورت و نزدیکی هم قرار گیرند موجب ایجاد یک سیگنال فلوئورسانس ویژه می‌گردد. یکی از این رنگها بوسیله منبع نورانی برانگیخته (Excitation) شده و انرژیش به رنگ دوم منتقل شده که سپس باعث خروج (Emission) یا تابش یک طول موج خاص می‌گردد که قابل آشکارسازی است. اگر این دو کاوشگر حاوی دورنگ به قدر کافی در نزدیکی هم نباشند (چنانچه در محلول این دو کاوشگر این حالت وجود دارد) نهایتاً خاصیت فلوئورسانس ویژه، دیده نمی‌شود. برای ایجاد FRET مؤثر جفت گیرنده – دهنده (Donor-Acceptor) بایستی فاصله بین 100–10 آنگستروم، و در عین حال خاصیت تحریکی (Excitation) و طیف تهییجی (Emission) هم پوشاننده (Overlapping) داشته باشند. در جدول یک ویژگیهای طیفی رنگهای گزارشگر فلوروفور دهنده و گیرنده مورد استفاده در سیستم FRET، لیست گردیده است.

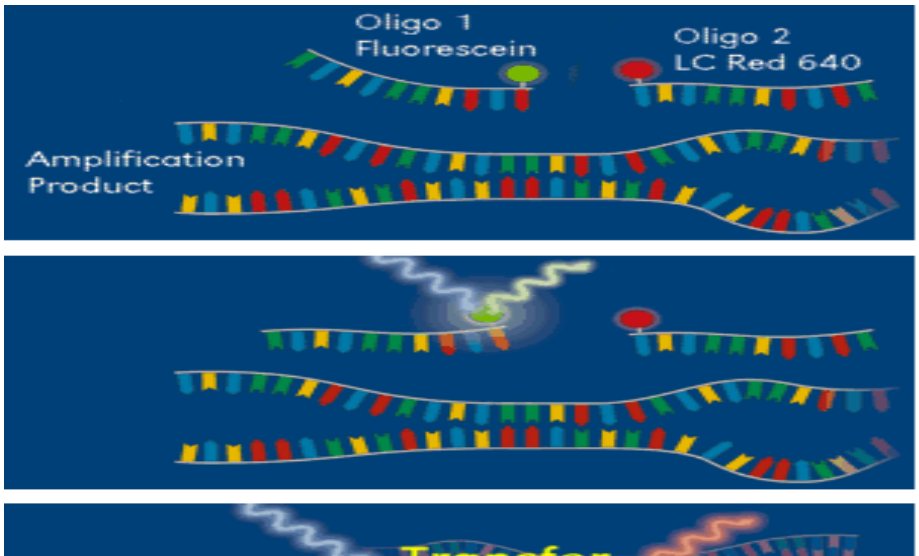
یکی از کاوشگرها در انتهای ´3 با فلوئورسین (Fluorescein) مارکدار شده است (دهنده FRET). کاوشگر دوم در انتهای ´5 با فلوروفور قرمز (Lc-Red-640 - Cy5) بعنوان گیرنده FRET مارکدار و انتهای ´3 آن بوسیله فسفور یلاسیون، جهت جلوگیری از Extension، تغییر یافته است. در عمل این تکنیک بدین صورت انجام می‌شود که ابتدا مولکول DNA دو رشته‌ای هدف دناتوره و تک رشته می‌شود. سپس دو کاوشگر که هر کدام بوسیله یک رنگ مارک دار شده است به سکانس ویژه خود در قسمت تقریباً وسط ژن هدف می‌چسبند. اگر این دو کاوشگر بطور صحیح و کامل به سکانس مکمل خود بچسبند، دقیقاً در مجاورت و نزدیکی هم بوده و نهایتاً بین آنها FRET بوجود آمده و خاصیت فلوئورسانس بروز می‌نماید. در هر سیکل که محصول افزایش پیدا می‌کند میزان چسبیدن این دو پرایمر مارک دار به سکانسهای هدف بیشتر و نهایتاً سیکل به سیکل میزان خاصیت فلوئورسانس افزایش پیدا می‌نماید(شکل 4).

جدول . 1 .ویژگی طیفی رنگهای گیرنده و دهنده در سیستم FRET

رنگ	جذب/تابش (نانومتر) *
دابسیل (Dabcyl)	453/هیچ
فلوئورسین (Fluorescein)	525/493
سایبرگرین یک	521/497
تت (Tet)	536/521
تامرا (TAMRA)	580/565
Texas Red-x	603/583
LC – Red – 640	640/625

* همه رنگهای این جدول، ماکزیمم جذب و ماکزیمم تابششان در حدود طول موج مرئی (visible) یا نزدیک به طول موج ماوراء قرمز (یعنی 700-400 نانومتر) می‌باشد.

شکل.4. سیستم پروب بر پایه انتقال انرژی فلوئورسانس.

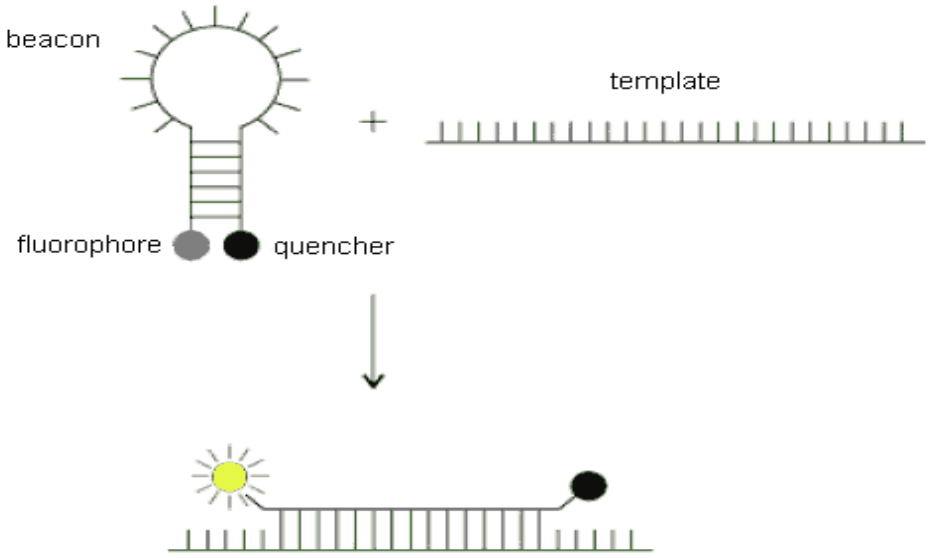


نکات مهم در ارتباط با سیستم FRET عبارتند از : 1) ظرف مویین شیشه‌ای یا پلاستیکی مورد استفاده بعنوان یک کووت عمل نموده و خاصیت فلوروفور بوجود آمده توسط فتودیودهای سیستم قابل بررسی و ثبت هستند. 2) قدرت انتقال حرارت در ظروف مویین شیشه‌ای فوق العاده بالاست. 3) لایت سایکلر دارای Ramp Time فوق العاده بالائی در حد 20–10 درجه سانتیگراد در ثانیه است. 4) از سیستم لایت سایکلر بدلیل توانائی در بررسی و آنالیز منحنی ذوب می‌توان جهت ژنوتایپینگ در یک لوله استفاده نمود.

پروبهای علامت مولکولی یا الیگوپروبهای سنجاق سری

Molecular Beacon Probes = Hairpin Oligoprobes

این پروبها بر اساس ساختار Hairpin (سنجاق سری)، به نوعی طراحی شده اند که رنگ فلوئورسنت گزارشگر در یک انتهای پروب و مولکول کوانچر(quencher) در انتهای دیگرچسبیده است. تا وقتی که این پروبها به شکل سنجاق سری هستند و به مولکول هدف هیبرید نشده اند بدلیل نزدیک بودن مولکول گزارشگر و کوانچر، خاصیت فلوئورسانس بروز نمی‌کند (یا به مقدار کم خاصیت فلوئورسانس وجود دارد). ولی زمانیکه پروب علامت مولکولی به هدف متصل شود ساختمان سنجاق سری باز شده و مولکول گزارشگر به اندازه کافی از مولکول کوانچر جدا می‌گردد و نهایتاً خاصیت فلوئورسانس بروز می‌نماید. در این زمان ابزار رییل تایم، خاصیت فلوئورسانس را شناسائی می‌نماید(شکل 5). پروبهای علامت مولکولی توسط کمپانیهای Stratagen, Intergen , Scorpions وارد بازار گردیده است.



شکل.5. پروبهای علامت مولکولی یا الیگوپروبهای سنجاق سری

آمپلیکون خودفلوئورسینگ Self – Fluorescing Amplicon

سیستم آمپلی فلور (Amplifluor) توسط کمپانی اینترژن (Intergen) ابداع گردیده است. این سیستم سریع، ساده و قابل تکرار بوده و دو کاربرد عمده: 1) در جهت ژنوتایپینگ از طریق پلئومورفیسم تک نوکلئوتید و 2) سیستم مستقیم شناسائی ژن، پیدا نموده است. سیستم مستقیم شناسائی ژن Amflifluor Direct Gene System بر اساس انتقال انرژی مولکولی از یک فلوروفور تحریک شده‌ای است که بطور طبیعی توسط یک کوانچر، در فرمت پرایمر سنجاق سری، مهار شده است. پرایمر آمپلی فلور مخصوص هدف در این تکنیک، شامل دو قسمت است. یک قسمت ´5 حاوی یک لوپ که به شکل دم بوده و قسمت ´5 آن با یک رنگ فلوئورسانس مثل فلوئورسین مارک دار شده است و بخش دیگر این لوپ در قسمت Stem با یک کوانچر یا گیرنده انرژی مثل DABSY1 مارک دار گردیده است. بخش دوم پرایمر آمپلی فلور یا ´3 آن، که مکمل هدف است.

پرایمرهای آمپلی فلور نچسبیده به هدف دارای خاصیت فلوئورسانس کمی هستند. علت آن مسئله نزدیک بودن رنگ فلوئورسانس به کوانچر می‌باشد. در طی سیکل اول، پرایمر آمپلی فلور یک، به اولین رشته اختصاصی مثلاً حاصل از سنتز cDNA، متصل گردیده و بوسیله آنزیم Taq بدنبال ´5 به ´3، رشته جدید ساخته می‌شود. در طی سیکل دوم، محصول حاصل از Extension پرایمر یک، بعنوان الگو برای پرایمر دوم (پرایمر Reverse) عمل می‌نماید. در اثر Extension بوسیله آنزیم Taq، پرایمر آمپلی فلور سنجاق سری باز می‌گردد و خاصیت فلوئورسانس بدلیل دور شدن رنگ گزارشگر از کوانچر تولید می‌گردد. این خاصیت در طی سکلهای بعدی، سیکل به سیکل با توجه به میزان یا مقدار محصول افزایش پیدا می‌نماید.

رویداد ایجاد Mismatch مابین الیگوپروب سنجاق سری و هدفش، موجب غیر پایدار شدن بیشتر دوپلکس در مورد پروبهای علامت مولکولی نسبت به الیگو و پروبهای خطی، مانند آنچه در سیستم پروبهای از دو طرف مارک دار شده و FRET دیده می‌شود می‌گردد. علت این امر همانا، پایداری بیشتر ساختار فضایی این نوع الیگوپروبهای سنجاق سری نسبت به پروبهای خطی است. بنابراین الیگوپروبهای سنجاق سری جهت بررسی پلئومورفیسم تک نوکلئوتید، ایده آل تر از الیگوپروبهای خطی می‌باشند. در عین حال انتخاب مواد فلوروفور متفاوت باعث بهتر شدن شیمی این نوع پروبها و بکار بردن روشهای مالتیپلکس PCR و استفاده از ابزارهای متنوع ریل تایم موجود در بازار، جهت این تکنیک گردیده است. بدلیل اینکه عمل این الیگوپروبها وابسته به هیبرید شدن صحیح بخش STEM می‌باشد طراحی دقیق این نوع الیگوپروبها بسیار مهم است.

آمپلیکون خودفلوئورسینگ Self – Fluorescing Amplicon

آمپلیکون خودفلوئورسینگ از لحاظ مفهومی شبیه الیگوپروبهای سنجاق سری است با این استثناء که مارک بطور غیرقابل برگشت پذیر در داخل محصول PCR داخل می‌گردد. در این ارتباط دو نوع آمپلیکون خودفلوئورسینگ 1ـ پرایمرهای Sunrise (تحت عنوان پرایمرهای سنجاق سری آمپلی فور Amplifluor مشهور است)، و2ـ پرایمرهای Scorpion شرح داده شده است. در قسمت قبل راجع به سیستم آمپلی فلور توضیح داده شد.

ریزآرایهٔ DNA وتراشهٔ ژنی

می دانیم که هزاران ژن و فراوردهٔ آنها (Protein , RNA) در یک ارگانیسم وجود دارد و باز می دانیم که روشهای مرسوم ، بطور معمول در یک تجربه بر روی یک ژن کار می کند ‹‹one gene in one Experiment ›› و بنابراین بدست آوردن تصویری کامل از فانکشن ژن کاری بس مشکل و سخت می باشد .در چند سال گذشته، یک تکنولوژی جدید بنام ریزآرایهٔ DNA (DNA Microarray) توجه میکروبیولوژیستها را به خود جلب نموده است. این تکنولوژی امیدهای زیادی را جهت مونیتور کردن ژنوم کامل روی یک chip ساده (تراشهٔ ساده) جهت بدست آوردن تصویری بهتر از اینتراکشن ها مابین هزاران ژن بطور همزمان، توسط محققین بوجود آورده است .

جهت این تکنولوژی ترمهای زیادی در ادبیات موضوع خلق شده است مانند : تراشهٔ زیستی (Biochip) ، تراشهٔ DNA، ریزآرایهٔ DNA (DNA-Microarray) ، آرایهٔ ژنی(Gene-Array) ، تراشهٔ ژنی (Gene chip) و تراشهٔ ژنومی (Genome chip) . از بین ترمهای فوق ، تراشهٔ ژنومی به دلیل اینکه دلالت براین موضوع دارد که این تکنولوژی، کل ژنوم را روی یک تراشهٔ تک مونیتور می نماید ارجحیت دارد

یک آرایهٔ مؤید آرایشی از نمونهٔ هاست . یک آرایه محیطی را جهت مچ شدن نمونه های DNA شناخته و ناشناخته بر اساس جفت شدن نوکلئوتیدها تهیه می نماید . این واکنش می تواند با استفاده از سیستمهای سنجش براساس میکروپلیت یا غشاء بلاتینگ استاندارد انجام گردد . واکنش و سیستم می تواند بوسیلهٔ دست یا بوسیلهٔ ابزار ربوتیک بر روی نمونه ها انجام شود . بطور عمومی آرایه ها یا بصورت درشت آرایه (Macroarray) و یا ریزآرایه (Microarray) که از لحاظ سایز نقطهٔ نمونه (Sample Spot) باهم متفاوتند انجام می پذیرد

. در درشت آرایه ها سایز نقطه های نمونه معمولاً درحدود 300 میکرون یا بزرگتر بوده بنابراین براحتی بوسیلهٔ سیستمهای عکسبرداری ژل و اسکنرهای blot ، قابل بررسی می باشند . در ریزآرایه ها سایز نقطه های نمونه کمتر از 200 میکرون بوده و بطور معمول هزاران نقطه بر روی تراشه قرار می گیرد . سیستم ریزآرایه مستلزم ابزار ربوتیک ویژه وعکسبرداری خاصی، که نوعاً بطور تجارتی بعنوان یک سیستم کامل قابل دسترس نیستند می باشد . ریزآرایهٔ DNA یا تراشهٔ DNA (DNA-chip) ، بوسیلهٔ ربوتهای با سرعت بالا برروی لامهای شیشه ای و گاهی اوقات برروی سوبستراهای نایلون که مناسب جهت واکنش پروب با نمونه ها است ساخته شده و اجازه بررسی بیان ژنها و مطالعات کشف ژن را میدهد . با استفاده از یک تراشه توسط محققین، امکان بررسی هزاران ژن بطور همزمان وجود دارد .

برای انجام یک آزمون ژنتیکی، به کمک تراشهٔDNA ، ابتدا مادهٔ ژنتیکی استخراج شده و با یک یا چند آنزیم محدود کننده برش داده می شود . این قطعات سپس به روش PCR تکثیر شده و با مواد فلوئورسنت، مارکدار میشوند . سپس مخلوط حاوی این قطعات با ریزآرایه هیبرید می شوند . در مرحلهٔ بعد یک اسکنر لیزری سطح تراشه را اسکن کرده و الگوی فلوئورسنت روی ریزآرایه که از هیبریدیزاسیون قطعات DNA نشاندار با پروبهای مربوط ایجاد شده است را بررسی می کند . اطلاعات حاصل مستقیماً به کامپیوتر منتقل شده و تفسیر نتایج به کمک برنامه های کامپیوتری خاصی انجام میشود. تهیهٔ ریزآرایه های DNA دارای مشکلاتی می باشد که عبارت است از : 1) نخست اینکه تهیهٔ تعداد زیاد انواع پروبها بصورت سنتتیک، بسیار وقت گیر و پرهزینه است. 2) هرچند روبوتها با دقت زیاد پروبها را در جایگاه خود قرار می دهند ولی بازهم فاصلهٔ بین آنها زیاد است و ریزآرایهٔDNA که از تعداد زیادی پروب ساخته شده مساحت زیادی را اشغال می کند .

در روشهای جدید از فتولیتوگرافی (Photolitography) که در صنایع ساخت نیمه هادیها و میکروچیپ های کامپیوتری بکار می روند برای سنتز و قرار دادن همزمان پروبها در جایگاه خود استفاده می شود . ریزآرایه هایی که با این تکنولوژی بدست می آیند تراشهٔ DNA نامیده می شوند.

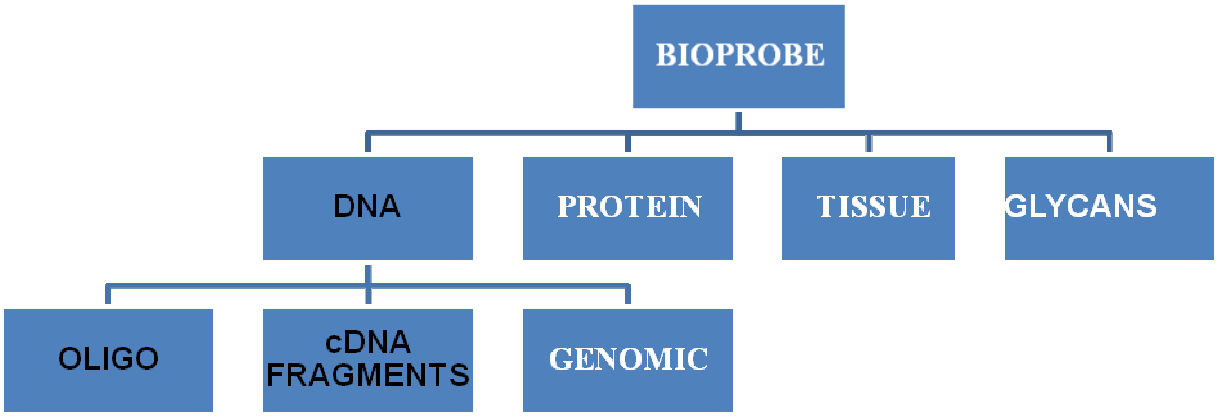
اصول ریزآرایهٔ و تراشه

اساس و پایه تکنولوژی ریزآرایه بر چهار پایه استوار است:

1) دو رگه سازی (Hybridization) : تکنیک دو رگه سازی (هیبریدیزاسیون)، تکنیک دهه های 80–60 میلادی می باشد (شکل8) و به فورمتهای مختلفی تحت عنوان ساترن بلات (Southern- blot) ، یا هیبریدیزاسیون DNA با DNA ، نورترن بلات (Northern-blot) ، یا هیبریدیزاسیون RNA با DNA ، وسترن بلات (Western-blot) ، یا هیبریدیزاسیون پروتئین با پروتئین، قابل انجام است. از معایب تکنیکهای هیبریدیزاسیون حساسیت پایئن آنها است. به همین خاطر تکنیکهای تکثیری (Amplification) در اواخر دهه 80 میلادی، جایگزین روشهای دو رگه سازی گردید. جفت باز شدن یا هیبریدیزاسیون، اساس و پایه ریزآرایه DNA است. یک آرایه، محیطی را جهت

جفت شدن نمونه های DNA شناخته و ناشناخته ، بر اساس جفت شدن نوکلئوتیدها تهیه نموده و موجب تعیین هویت ناشناخته ها می گردد.

در ارتباط با دو رگه سازی، دو اصطلاح کاوشکر یا پروب و هدف مطرح می باشد. پروب یک اسید نوکلئیک با ترادف مشخص است در صورتیکه هدف یک اسید نوکلئیک آزاد در نمونه است که بایستی حضورش و یا مقدارش آشکار شود. پروبهای استفاده شده در تکنیک ریزآرایه می تواند DNA ، پروتئین، بافت، قندها و حتی موارد دیگر باشد. مشخصا در ریزآرایه DNA ، پروب DNA می باشد و این DNA می تواند الیگونوکلئوتید، یا قطعات cDNA و حتی DNA ژنومیک باشد (شکل 6).



شکل.6. انواع پروبهای مورد استفاده در تکنیک ریزآرایه

2) تکنیکهای تکثیری: پایه دوم تکنولوژی ریزآرایه، تکنیکهای تکثیری است که البته خود به سه گروه الف) روشهای تکثیری هدف (مانند PCR، SDA، 3SR) ب) روشهای تکثیری پروب (LCR، تکثیر بر اساس رپلیکاز QB) ج) روشهای تکثیر سیگنال، تقسیم می شود. از بین روشهای فوق الذکر، تکنیکهای تکثیر هدف (مانند PCR) نقش به سزایی در توسعه تکنیک ریزآرایه داشته است.

3و4) نانو تکنولوژی و بیوانفورماتیک : نانو تکنولوژی جهت مینیاتوره کردن تکنولوژی ریزآرایه و بیوانفورماتیک جهت تجزیه و تحلیل داده ها، نقش به سزائی داشته اند . نانوتکنولوژی (فن آوری نانو) ، فن آوری چیدمان دلخواه اتم ها و مولکولها و به دنبال آن تولید مواد جدید با خواص مطلوب است . این دانش در واقع تحقیق و توسعه در سطح اتم و مولکول در اندازه هائی در حدود یک تا صد نانومتر جهت دستیابی به درک اساسی از پدیده ها ونیز استفاده از سیستم ها و وسایلی است که به دلیل داشتن اندازه های کوچک دارای ویژگی ها و عملکرد جدیدی هستند . فن آوری نانو به سه قسمت تقسیم می شود : فن آوری نانو« خشک » که بیشتر در ارتباط با نانو مواد و کاربرد فن آوری نانو در مباحث صنعتی است . فن آوری نانو « تر » که به مطالعه فن آوری نانو درمحیطهای آبی و موجود زنده می پردازد و طی آن ساختمان مواد وسایر ساختارهای سلولی که در ابعاد نانو هستند، مورد مطالعه قرار می گیرند . شاخهٔ نانو« محاسباتی» (Nano simulation) نیز بیشتر در ارتباط با شبیه سازی در ابعاد نانو است . در واقع شبیه سازی رفتار نانو ذرات، نانوتیوبها و سایر سیستمها در ابعاد نانو با استفاده از نرم افزارهای طراحی شده و قبل از ساخت آنها صورت می گیرد . رویکرد به نانو از دو طریق امکانپذیر است : یکی رویکرد از بالا به پائین که در آن با کوچکتر کردن سیستمها و ساختارها به فن آوری ایجاد ساختارهائی در ابعاد نانو می رسیم . رویکرد دوم، رویکرد از پائین به بالا است که از ابتدا با چیدمان اتم ها، ساختارهایی با ابعاد نانو ایجاد می شود . امروزه کلمهٔ نانو را پیش از نام هررشته قید کنند معنای خاص خود را می یابد . بطور مثال مواد (نانومواد) ، بیوتکنولوژی (نانو بیوتکنولوژی) و یا داروسازی (نانوداروسازی) . نانوبیوتکنولوژی در کوچک کردن ابعاد ریزآرایه ها نقش به سزائی در سالیان اخیر بازی نموده و موجب شده است بتوان برروی یک ریزآرایه به ابعاد یک اینچ، حتی بتوان تا یک میلیون spot قرار داد(شکل 7) .

شکل.7. یک تراشه ژنی حاوی پانصد هزار SPOT ، ساخت کمپانی Affymetrix

ریزآرایهٔ DNA و تراشه های DNA

ریزآرایهٔ DNA و تراشه های DNA دارای اصول علمی مشابه بوده ولی از لحاظ ساخت ونوع پروب متفاوت، ولی هدف یکسان می توانند داشته باشند . سیستم ریزآرایه بصورت گذاشتن نقطه (spotted) میباشد . پروبها در این سیستم شامل محصولات cDNA تکثیر شده

توسط PCR ، یا سکانسهای بیان شدهٔ مارکدار است . اندازهٔ این پروبها بین 2/4 kb ـ 0/6 می باشد . نقطه های پروب بوسیله روبوت برروی عموماً اسلایدهای شیشه ای جامد گذاشته می شود . می توان تا حدود 10/000 یا بیشتر نقطه را بر روی یک اسلاید شیشه ای میکروسکوپ ، توسط ابزار روبوتیک قرار داد . این روش بطور سنتی بنام DNA - Microarray نامیده شده و در دانشگاه استانفورد توسعه یافته است .

تراشه های DNA سنتزی می باشند . بعبارت دیگر پروبهای این سیستم که دارای اندازهٔ 28– 20 باز است از طریق تکنیک فتولیتوگرافی برروی بسترهای جامد تثبیت گردیده است . این روش بطور سنتی تحت عنوان DNA - chips که توسط کمپانی Affymetrix توسعه یافته ، نامیده شده است . این کمپانی محصولات خود را تحت عنوان Genechip وارد بازار کرده است .

بایستی توجه کرد که ریزآرایهٔ DNA با تراشهٔ ژنی از لحاظ تکنولوژیک باهم متفاوتند اما خیلی از مقاله ها و سایتها ، در بیان موضوع این دو رایکسان فرض نموده اند .

سه روش عمدهٔ ساخت و تولید ریزآرایه ها عبارتند از :

1) فتولیتوگرافی (Photolitography)
2) نقطه گذاری مکانیکی (Mechanical Spotting)
3) پیزوالکتریک (Piezoelectric) یا (ink jetting)

روش ساخت DNA چیپها به روش Photolitography

در ساخت DNA چیپها به کمک فتولیتوگرافی، ابتدا اسلایدهای کوچک شیشه ای ، با لایه ای از ماده ای مخصوص بنام مادهٔ اتصال دهنده (Linker) پوشانده میشود . سپس با تاباندن پرتوهای لامپ جیوه به مادهٔ مزبور، آن را فعال نموده و آمادهٔ اتصال شیمیائی با نوکلئوتیدها می نمایند . در مسیر این پرتوها یک ماسک لیتوگرافی قرار دارد که منافذ آن بکمک کامپیوتر کنترل می شود و در اثر آن ، پرتوها بطور انتخابی به نواحی دلخواه روی صفحه تابانده می شوند. در این هنگام یک نوع نوکلئوتید (مثلاً A) اضافه می شود . به این ترتیب این نوکلئوتیدها در نواحی فعال شده قرار می گیرند . انتهای 5 هریک از این نوکلئوتیدها بوسیلهٔ یک گروه محافظت کننده مسدود شده است . در گام بعدی باتغییر منافذ ماسک بوسیلهٔ کامپیوتر به ترتیب نواحی دیگر برای اضافه کردن نوکلئوتیدهای بعدی آماده می شوند . در این مرحله یک لایه از نوکلئوتیدها ، که هر یک نوکلئوتید اول یک اولیگو پروب محسوب میشود بر روی صفحه متصل شده اند . در مرحلهٔ بعد در اثر تابش پرتوهای لامپ جیوه از طریق منافذ ماسک به لایهٔ اول نوکلئوتیدی ، گروههای محافظت کنندهٔ نوکلئوتیدها در نواحی مورد نظر جدا شده و انتهای 5 آنها برای انجام واکنش شیمیائی با نوکلئوتیدهای بعدی آزاد می شود . در این هنگام نوکلئوتید بعدی (مثلاً C) اضافه

می شود که به نوکلئوتیدهای ردیف اول که انتهای آزاد دارند متصل می شود . با تغییر منافذ ماسک این کار برای نوکلئوتیدهای بعدی تکرار می شود تا دومین نوکلئوتید هر پروب در جای خود قرار بگیرد . با تکرار این مرحله می توان اولیگوپروبهائی با طول دلخواه ساخت. تهیهٔ اولیگوپروبها با روش فوق در مدت زمان کوتاهی انجام می شود . در این روش تعداد زیادی از پروبها در مساحت کوچکی قرار داده می شوند . معمولاً برای تشخیص واضح پروبها در هر جایگاه مشخص از چندین (حدود 1 میلیون) پروب مشابه استفاده می شود . به این جایگاه Feature گفته می شود . یک DNA - chip استاندارد ، دارای سطحی به اندازهٔ 1/6 cm2 است که دارای بیش از یک میلیون Feature (پروب) مختلف می باشد .

در تکنیک نقطه گذاری الکتریک ، پینهای نقطه گذار جهت انتقال DNA به سطح اسلاید مورد استفاده است . نهایتاً در تکنیک Piezoelectric ، از جریان الکتریکی جهت گذاشتن و پخش DNA در محلهای مورد نظر ، کمک گرفته شده است. از نکات مهمی که می توان در مورد تراشه های ژنی متذکر شد ، شاید بتوان به موارد زیر اشاره نمود :

1) الیگونوکلئوتیدهای عموماً 20-28 مری ، بطور مستقیم برروی شیشه سنتز می شوند .
2) سنتز این الیگونوکلئوتیدهای on - site ، از طریق تکنیک فتولیتوگرافی است .
3) حداقل 5 الیگو به ازای هر cDNA ، بعلاوهٔ تعداد مشابه از کنترلهای منفی بکار می رود .
4) وسایل مورد نیاز شامل یک ایستگاه مایع جهت هیبریدیزاسیون و یک اسکنر خاص است .
5) فقط از یک رنگ فلوروکروم به ازای هیبریدیزاسیون استفاده می شود و سیستم رقابتی نیست
6) این سیستم وروش گرانتر می باشد .
7) می توان بیش از پانصدهزار محل پروب برروی یک سطح به اندازهٔ 1/28 سانتی متر مربع ایجاد نمود .
8) تست به شدت قابل تکرار بوده و زمان لازم برای set - up کردن فوق العاده کاهش پیدا نموده است .
9) سرعت آن نسبت به ریزآرایهٔ DNA بیشتر است .
10) هزینهٔآرایه تراشه، کمتر از آرایهٔ میکرو اری است .
11) انعطاف هم در مورد این سیستم بیشتر از ریزآرایهٔDNA است .

کاربردهای تکنولوژی ریزآرایهٔ DNA و تراشه های ژنی عبارت است از:

1) تشخیص جهش ها به کمک DNA-Chip : شناسائی تغییرات جهشی در مولکول DNA در تشخیص و پیش آگهی، بسیار اهمیت دارد. برای بررسی جهش های یک ژن، ابتدا میکروچیپ مطابق باتوالی نرمال (Wild type) (یا توالی مرجع) آن ساخته می شود سپس نمونه DNA حاوی ژن از فرد مورد نظر تهیه می شود و توالی ژن مورد نظر بوسیلهٔ PCR تکثیر شده بطور همزمان بصورت فلورسنت نشاندار می شود . سپس قطعات نشاندار شده با DNA چیپ هیبرید می شوند . شرایط هیبریداسیون به گونه ای است که هیبریداسیون توالی مورد آزمایش با چیپ نسبت به جفت شدن اشتباهی (mismatch) حساس است و این حساسیت در نوکلئوتید متغیر بیشتر است در نتیجه هیبریداسیون کامل با پروبی از هر دسته انجام می شود که دارای بهترین تطابق (Best match) است.

2) تعیین توالی DNA بوسیلهٔ Minisequencing DNA-chip : روش تعیین توالی قطعات DNA بکمک DNA-chip را با یک مثال ساده توضیح می دهیم : فرض کنید هدف تعیین توالی یک قطعهٔ DNA مجهول به طول 6bp با استفاده از آرایه هائی از پروبهایی به طول 3 نوکلئوتید است . این آرایه حداکثر از 64 نوع تری نوکلئوتید مختلف تشکیل شده است (چون از چهار نوکلئوتید A,T , G , C حداکثر 64 نوع تری نوکلئوتید بدست می آید) . برای تعیین توالی ، ابتدا DNA مجهول نشاندار شده وسپس با DNA-chip حاوی 64 پروب تری نوکلئوتید هیبرید می شود . پس از شستشو بررسی می شودکه DNA مجهول با چه پروبهائی هیبرید شذه است . فرض می کنیم مشخص شود که با پروبهای CTG ، TCA ، GAG و AGA هیبرید شده باشد . از این اطلاعات می توان نتیجه گرفت که تری نوکلئوتید های فوق در ساختار DNA مجهول وجود داشته اند . از کنار هم قرار دادن آنها ، توالی CTGAGA بدست می آید که توالی مکمل آن (GACTCT) توالی DNA مجهول می باشد . اگر بجای پروبهای 3 نوکلئوتیدی ، از پروبهای بطول 8 نوکلئوتید، بعنوان اولیگو پروب استفاده شود با آن می توان توالی DNA هایی با طول 200 نوکلئوتید را تعیین کرد . در این حالت DNA-chip از 65536 اولیگو پروب مختلف تشکیل شده است . امروزه در تعیین توالی DNA از DNA چیپهائی استفاده می شود که دارای پروبهایی بطول 25 نوکلئوتید می باشند و با این DNA چیپها می توان DNA هائی بطول بیش از 700 نوکلئوتید را در کمتر از چند ثانیه تعیین توالی کرد .

3) cDNA-microchips : به کمک این روش می توان همهٔ ژنهائی را که در یک زمان در سلول بخصوصی بیان می شوند را مشخص کرد . برای این منظور در DNA-chip از پروبهای اختصاصی برای هر یک از ژنهای مورد نظر که تاکنون شناسائی شده اند استفاده می شود . در این روش ابتدا mRNA ی کل سلولهای مورد نظر استخراج شده و به روش RT-PCR از روی آنها DNA نشاندار ساخته می شود . سپس مخلوط cDNA با DNA-chip هیبرید می شود . اتصال DNA به پروبهای اختصاصی ، نشانگر بیان شدن ژن مربوطه ، در سلولهای مورد نظر است.

4) کاربرد در تحقیقات توکسیکولوژیک (توکسیکو ژنومیکس) : توکسیکوژنومیکس هیبریدیزاسیون توکسیکولوژی مولکولی و ژنومیکس عملی است . هدف نهائی توکسیکوژنومیکس ، یافتن ارتباط مابین پاسخهای توکسیک به توکسیکانتها (Toxi cants) و تغییرات در پروفایل ژنتیکی افراد در معرض مواد توکسیکانت می باشند . کاربرد سیتمهای ریزآرایه در سنوات اخیر کمک زیادی به تحقیقات توکسیکولوژیک نموده است .

5) کاربرد در کشف داروها (فارماکوژنومیکس) : چرا برخی داروها در بعضی از افراد نسبت به دیگران مؤثرند ؟ و چرا برخی دارو ها در برخی بیماران بشدت توکسیک می باشند ؟ هدف نهائی علم فارماکوژنومیکس (هیبریدیزاسیون فارماکولوژی مولکولی با ژنومیکس عملی) ، با کمک تکنولوژی ریزآرایهٔ DNA ، پیدا کردن ارتباط مابین پاسخهای درمانی به دارو ها و پروفایل ژنتیکی بیماران است.

منابع جهت مطالعه بیشتر

1) Shahhosseiny MH. Tehrani, R. "Polymerase Chain Reaction (PCR)" 165 page, Publisher: Islamic Azad University, 2005

2) Shahhosseiny MH. ' Basic Molecular diagnosis' 430 page, Publisher: Islamic Azad University, 2005

3) Shahhosseiny MH. Rahimi AA. ' Molecular Genetics:concepts & applications' 406 page,

Publisher: Islamic Azad University, 2007

4) Shahhosseiny MH. Rahimi AA. ' Molecular Genetics:concepts & applications' 380 page,

Publisher: Islamic Azad University, 2007

5) Shahhosseiny MH, Rahimi, AA. ' Fundamentals of Genetics' 532 page, Publisher: Islamic Azad University, 2007 (in press)

6) Klein, G., Hallman, C., Casas, I. A., Abad, J., Louwers, J., Reuter, G. (2000). Exclusion of *vanA, vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. Journal of Applied Microbiology 89, 815- 824.

7) Bellin, T., Pulz, M., Matussek, A., Hempen, H.-G., Guntzer, F. (2001). Rapid detection

of enterohemorrhagic *Escherichia coli* by real-time PCR with fluorescent hybridization probes. Journal of Clinical Microbiology 39, 370-374.

8) Malinen, E., Laitinen, R., Palva, A. (2001). Genetic labeling of lactobacilli in food grade manner for strain-specific detection of industrial starters and probiotic strains. Food Microbiology 18, 309-317.

9) Bonnet, R., Suau, A., Doré, J., Gibson, G. R., Collins, M. D. (2002). Differences in rDNA libraries of faecal bacteria derived from 10- and 25-cycle PCRs. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 757-763.

10) Laitinen, R., Malinen, E., Palva, A. (2002). PCR-ELISA I: Application to simultaneous analysis of mixed bacterial samples composed of intestinal species. Systematic and Applied Microbiology 25, 241-248.

11) Kaplan, C. W., Astaire, J. C., Sanders, M. E., Reddy, B. S., Kitts, C. L. (2001). 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Applied and Environmental Microbiology 67, 1935-1939.

12) de Roos, N. M., Katan, M. B. (2000). Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. American Journal of Clinical Nutrition 71, 405-411.

13) Malinen, E., Mättö, J., Salmitie, M., Alander, M., Saarela, M., Palva, A. (2002). PCR-ELISA II: Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galactooligosaccharide preparation. Systematic and Applied Microbiology 25, 249-258.

14) Farrelly, V., Rainey, F. A., Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and *rrn* gene

copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Applied and Environmental Microbiology 61, 2798-2801.

15) Bélanger, S. D., Boissini, M., Ménard, C., Picard, F. J., Bergeron, M. G. (2002). Rapid detection of Shiga-toxin producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the Smart Cycler. Journal of Clinical Microbiology 40, 1436-1440.

16) Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., Hammes, W. P. (2001). Detection of *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc,* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 67, 2578-2585.

17) Wang, R., Cao, W., Cerniglia, C. E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Applied and Environmental Microbiology 62, 1242-1247.

18) Ampe, F., Sirvent, A., Zakhia, N. (2001). Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. International Journal of Food Microbiology 65, 45-54.

19) Asahara, T., Nomoto, K., Shimizu, K., Watanuki, M., Tanaka, R. (2001). Increased resistance of mice to *Salmonella enterica serovar Typhimurium* infection by synbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. Journal of Applied Microbiology 91, 985-99.

20) Irianto,A. and Austin,B.2002.Probiotics in aquaculture.journal of Fish Diseases.25: 633-642.

21) Bach, H.-J., Tomanova, J., Schloter, M., Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in 45 environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. Journal of Microbiological Methods 49, 235-245.

22) Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., Boches, S. K., Dewhirst, F. E., Griffen, A. L. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. Journal of Clinical Microbiology 40, 1001-1009.

23) Fuller, R. (1999). Probiotics for farm animals. In: Tannock, G. W., ed. *Probiotics: a critical review.* Horizon Scientific Press, New York, 15-22.

24) Harmsen, H. J. M., Gibson, G. R., Elfferich, P., Raangs, G. C., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Argaiz, A., Roberfroid, M. B., Welling, G. W. (2000a). Comparison of viable cell counts and fluorescence in situ hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. FEMS Microbiology Letters 183, 125-129.

25) Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., He, T., Degener, J. E., Welling, G. W. (2002). Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. Applied and Environmental Microbiology 68, 2982-2990.

26) Heilig, H. G. H. J., Zoetendal, E. G., Vaughan, E. E., Marteau, P., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M. (2002). Molecular diversity of the *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. Applied and Environmental Microbiology 68, 114-123.

27) Bednar, M., (2000) DNA microarray and application. Med. Sci. Monit, 6(4): 796-800.

28) Nakanishi, T., (2001) Recent Advances in DNA microarrays. Acta. Med. Okayama. 55(6): 319-328.

29) Gabig, M., (2001) An introduction to DNA chips:principle, technology, applications and analysis. Acta Biochimica Polonica, 48(3): 615-622.

پروبیوتیکها

مهناز مظاهري اسدي، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران12 Mxmazaheriassadi@yahoo.com

تعریف

کلمۀ پروبیوتیک ازیک لغت یونانی و به معنای حیاتبخش گرفته شده و درطول زمـان نیز تعریفهای متفاوتی ازآن شده است . محصولات غذایی پروبیوتیکی که امروزه یکی از مباحث جذاب غذایی، تغذیهای و درمانی را بهخود اختصاص داده اند، جزء غذاهای فراویژه طبقه بندی می شوند. غذاهای فراویژه به محصولاتی اطلاق میشود کـه عـلاوه برداشـتن ارزش تغذیـه ای، دارای اثرات درمانی و سلامتبخش برای مصرف کننده نیز باشند.

درطی دهۀ 1960، به جهت مقابله با استفادۀ وسیع از آنتی بیوتیکها و اثرات جانبی آنها درحیوانات مزرعه ای، توجه به استفاده از مکملهای حاوی باکتریایی زنده، رو به افزایش گذاشت. لیلی و استیلول برای اولین بار کلمه پروبیوتیک را برای توصیف مواد ترشحی ازیک موجـود تکیاخته که رشد موجود دیگری را تحریک مینمود بکار بردند(9).

اسپرتی این کلمه را برای توصیف ترشحات بافتی که رشد میکروبی را تحریک مینمودند بکارگرفت و پارکر آن را به عنوان مکملهای غذایی حیوانی که حاوی میکروارگانیسم بوده و با مشارکت در ایجاد تعادل میکروفلور رودهای اثرات سودمندی برسلامت میزبان دارند تعریف نمود. البته این تعریف اخیر آنتی بیوتیکهایی را که به منظور بهبود رشد حیوانات مزرعه ای استفاده می شد را نیز دربر می گرفت. فولردر سال 1989 تعریف دیگری برای پروبیوتیک ارائه داد. که عبارت بود از مکملهای غذایی میکروبی زنده ای که با تنظیم فلورمیکروبی سیستم گوارش و جایگزین شدن در روده، باعث ایجاد اثرات مفید و سودمند درمانی و سلامت بخش، برای مصرف کننده میشوند.این تعریف براهمیت سلولهای زنده به عنوان مؤلفهای ازیک پروبیوتیک مؤثر تکیه داشته و آنتی بیوتیکها را از آنها مجزا می ساخت. Havenar و همکارانش پروبیوتیکها را به عنوان یک کشت منفرد یا مخلوطی از میکروارگانیسمها تعریف نمودند که زمانی که توسط انسان یا حیوان مصرف میشوند با بهبود ویژگیهایمیکروفلور داخلی، اثرات مفیدی را در میزبان بجای میگذارند (7). این تعریف مفهوم پروبیوتیکها را به چند طریق متحول ساخت به طوری که فعالیت پروبیوتیکها را به میکروفلوردستگاه گوارش محدود نساخته و احتمال کاربرد آن را در اجتماعات میکروبی دیگر مثلاً درپوست، دستگاه تنفس و دستگاه تناسلی نیز در بر میگرفت اخیراً گروهی از دانشمندان اروپایی پیشنهاد کرده اند. در قرن حاضر معنی پروبیوتیک ها گسترده تر شده و تحت عنوان »میکروارگانیسمهایزنده ،باکتریهای لاکتیک یا سایر باکتریها و مخمرهایی که به صورت سلولهای خشک و یادر محصولات تخمیری، استفاده میشوند، ازطریق مصرف خوراکی، باعث بهبود خصوصیا توفلور طبیعی میزبان شده واثرات مفید روی سلامت مصرف کننده به جا میگذارند(51).

اکولوژی سیستم گوارش انسان

مجاری گوارش انسان از ابتدا تا انتها)دهان، مری، معده، دئودنوم، روده و کولون(نقش ویژه ای در تجزیۀ موادغذایی به انرژی و سایر موارد موردنیاز بدن دارد. دریک طول عمر طبیعی، درحدود 60 تن غذا ازاین کانال عبور میکند. محیط گوارش انسان کمپلکس پیچیده ایی از میکروارگانیسمهای مختلف است و ازنظر بیولوژیکی، زنده ترین و فعالترین ارگان بدن محسوب میشود. گذشته از بعد تغذیه ای و مسأله جذب مواد غذایی مصرفی، فعالیتهای متابولیکی پیچیده دراین بخش اثر مشخصی روی سلامتیانسان دارد(۱۸،۱۲،۵) برآورد شده است که در بدن انسان حدود 10^{14} میکروب زنده وجود دارد که این تعداد حتی از تعداد سلولهای بدن فرد که 10^{13} می باشد، بیشتراست. بیش از 400 گونه باکتریاییمختلف در مدفوع و رودۀ بزرگ یک فرد سالم شناسایی شده است که ازنظر جمعیت میکروبی به حدود 10^{13} cfu درهر گرم میرسد. این تعداد در رودۀ باریک به 10^{8}- 10^{4} cfu و در معده فقط 10^{2}- 10^{1} cfu درهر گرم می رسد(5).

مطالعات آزمایشگاهی نشان می دهد که در مجاری گوارشی یک مرد متوسط درحدود یک کیلوگرم باکتری و در مجاری گوارشی یک زن متوسط درحدود 800 گرم باکتری وجود دارد. فلورمیکروبی سیستم گوارشی انسان، از بدو تولد تا دورۀ میانسالی دستخوش تغییرات اساسی میباشد. سیستم گوارش جنین و نوزاد تازه متوسط شده فاقد هرگونه باکتری و استریل میباشد. اما بلافاصله بعد از تولد، جایگزینی باکتریها دراین بخش آغاز میشود. عواملی مثل شرایط بهداشتی، تکنیکهای زایمانی)طبیعی – سزارین(، فلورمیکروبی مجاری تولد،

نحوهٔ تغذیه و ... تماماً روی گونه های میکروبی مجاری گوارش نوزاد تأثیر مـی گذارنـد. طـی 2الـی 5روز اول علاوه بر کلی فرمها[1]، انتروکوکسیها[2]، کلستریدیا[3]، و لاکتوباسیلوسها، بیفیدوباکتریومها تظاهرمییابند و تا پایان هفته اول، فلورمیکروبی غالب را تشکیل میدهند، به نحویکه در نوزادان تغذیه‌شده با شیر مادر جمعیت این باکتری به 10^{10}-10^{11} cfu درهر گـرم مـدفوع مـیرسـد و ایـن درحالی است که حضورکلی فـرمهـا و سـایر بـاکتریهـا بـسیار ناچیزاسـت. لاکتوکوکـسی، انتروکوکسی و کلی فرمها کمتر از 1 درصـد جمعیـت را تـشکیل مـیدهنـد و باکتروئیـدها [4]، کلستریدیا و سایر باکتریها اصلاً وجود ندارند(18،12،5).پس میتوان به این نتیجه رسید که، نحوهٔ تغذیهٔ نوزاد (شیرخشک یا شیر مادر)بـه شـدت روی فلورمیکروبی مجاری گوارشی او تأثیرگذار میباشد. درمجاری گوارشی کودکان تغذیه شده با شیر مادر، میزان باکتریهای بیفیدو بیشتر از کودکان تغذیه شده با شیر خشک مـی باشـد کـه باعث میشود تا میزان باکتریهای بیهوازی اختیاری دراین کودکان کمتر باشد.به علاوه شیرمادر دارای قدرت بافری کمتری در مقایسه با شیر خـشک مـیباشـد و ایـن‌موجب میگردد تا مجاری رودهای دراین کودکان به سرعت اسیدی شود و این اسیدیته یک عامل بازدارندهٔ رشد کلستریدیاها و باکتریوئیدهای دیگر میباشد و این محیط، یک محیط اختـصاصی‌برای رشد بیفیدوها میگردد. علاوه بر موارد ذکرشده، شیرمادر حاوی اولیگوساکاریدهای طبیعی میباشد که رشد باکتریهای مفید را تحریک مینماید. پس نتیجه میشود که شیر مادر جدا از کامل بودن ازنظر مواد مغذی و ... شـامل هـزاران‌ترکیب بیولوژیک میباشد که موجب تقویت سیستم ایمنی نوزاد میشـود و اکوسیـستم داخلـی مجاری گوارشی را تحت تأثیر قرار میدهد.

با از شیرگرفتن نوزاد و بالارفتن این جمعیت میکروبی، سیستم گـوارش تغییـر مـیکنـد.بیفیدوباکتریا کاهش مییابد و باکتروئیدها فلورغالب را تـشکیل مـیدهنـد و در مقـام بعـدی،یوباکتریوم جای میگیرد. فلورمیکروبی افراد بالغ و بزرگسال، تقریباً ثابت است اما با افـزایش‌سن، فلورمیکروبی بازهم دستخوش تغییر می شود، بـه نحـوی کـه کـاهش قابـل توجـه تعـدابیفیدوباکتریا و افزایش باکتریهای مضر مثل کلستریدیوم پرفرینژنس باعث ایجـاد اسـهال در سالمندان میشود(14،5). ترکیب پیچیدهٔ فلورسیستم گوارش در افراد سالم تقریباً ثابت است.علاوه برسن، عوامل دیگری که میتوانند این بالانس میکروبی را به هم بزننـد، فـشارهای‌روانی، رژیم غـذایی، بیمـاری، داروهـا، فـسادهای میکروبـی، یبوسـت، آب و هـوا، موقعیـت جغرافیایی،نژاد، شرایط اقتصادی و روش زندگی میباشند. هرگونه تغییری دراین تعادل میکروبی،اجازهٔ مسلط شدن میکروب هـای مـضر را خواهـد داد و باعـث بـروز بیمـاریهـای گوارشـی میشود(8) بدین ترتیب فلورمیکروبی سیستم گوارش به دو دلیل مهم است: 1-باوجود فلور مفید، میکروارگانیسمهای پاتوژن قدرت رشد و تکثیر ندارند. فعالیت متابولیک برای میزبان ایجاد میکنند که قدرت و دامنهٔ این فعالیت ماننـد کبـداست.این فلورمیکروبی را میتوان در سه گروه تقسیمبندی کـرد: مـضر، مفیـد و بـی تـأثیر در سلامتی انسان‌بیفیدوباکتریومها و لاکتوباسیلها، در دسته باکتریهای مفید، و لیستریا، سالمونلا، گونه های‌خاص اشرشیاکلی، کلستریدیوم،

1 -Coli form

2- Entero cocci

3- Clostridia

4- Bacteroid

پروتئوس و انواعی از باکتروئیدها در دسته باکتریهـای مـضرقرار میگیرند. این باکتریها با تولید ترکیبات مضری مانند آمینها، ایندول، سولفات هیدروژن وفنلها، از مواد غذایی مصرفی، باعث ایجاد مشکلات خاص گوارشی میشوند. ایـن بـاکتریهـامیتوانند در موارد خاص، -

پاتوژن نیز باشند(6،4).مخاط روده های سالم به همراه فلورمیکروبی طبیعی، به صـورت مـانعی بـر سـر راه نفـوذباکتریها پاتوژن، آنتیژنها و سایر مواد مضر قرارگرفته است. در افراد سالم، این مـانع پایـداراست و فعالیت میکرو فلور طبیعی را فراهم میکند. جهت حفظ این تعادل میکروبی، باکتریهایسودمندی همچون لاکتوباسیلوسهای گرم مثبت و بیفیدوباکتریها باید غالب باشند. بهطوریکـه حدود 58 درصد از فلورمیکروبی رودۀ فرد سالم باید شامل این باکتریهای مفید باشد.زمانیکه فلورمیکروبی طبیعی و یا سلولهای اپیتلیال به نحـوی آسـیب ببیننـد، نقـص درمکانیسم عملکرد دیواره مشاهده می شود که منجر به بروز اختلالاتی در وضعیت فرد مـیشـود.عوارضی مثل تولید گاز، نفخ، مسمومیت و سوء هاضمه، اسهال و ... ایجادمیگردد. گونه های معمول مورد استفاده در صنعت لبنیات، قابلیـت چـسبندگی بـه مخـاط روده را ندارند و این ویژگی به باکتریهای پروبیوتیک نسبت داده شده است.

تحقیقات نشان داده است که این باکتریها به راحتی از معده عبور و وارد مجاری روده ای میشوند. مصرف باکتریهای پروبیوتیک میتواند تعادل میکروفلورسیستم گوارش را بـه سـمتباکتریهای مفید متمایل سازد و به این ترتیب با غلبه بر انواع مضر، علاوه بر خنثیکردن اثـرات نامطلوب این گروه، اثرات درمانی منحصر به فرد خود را ایفا نمایند(4).

دکتر Metchenikoff براین باور بود که اگر فلور رودهای دریک بـالانس متعـادل باشـد،انسان میتواند تا 150 سال عمر کند. ویژگیهای سویههای پروبیوتیکیبیش از بیست ویژگی مختلف برای انتخاب سویههای پروبیوتیکی درنظر گرفتـه شـده است ولی برطبق یک توافق عمومی معیارهای اصلی جهت انتخاب آنها برای مـصارف غـذاییانسان عبارتنداز:

- منشاء انسانی داشته باشد.
- بیماریزا نباشند.
- در برابر اسید معده و محیط صفراوی مقاوم باشند.
- قادر به تحمل فرایندهای تکنولوژیکی بوده و در طی دوره ماندگاری محصول زنـده بـاقی بمانند.
- در شرایط in vitro و in vivo به سهولت و به سرعت تکثیر یابند.
- در برابر آنتی بیوتیکهای متداول مورد استفاده در مواد غذایی مقاوم باشند.
- توانایی انتقال مواد ژنیکی مانند فاکتورهای مقاومت را به میکروارگانیسمهای بیماریزا نداشتهباشند.
- درطی عبور از دستگاه گوارش زنده مانده و توانایی چسبیدن بـه دیـواره رورده را داشـتهباشند.
- باتولید مواد ضدمیکروبی اثر پادزیستی در برابر میکروبهای بیماریزا داشتهباشند.
- اثرات مفید و سودبخش آنها بر سلامتی انسان سندیت داشته باشد.

تا به امروز مطالعات بیشماری در زمینۀ تأیید قابلیـتهـای فـوق صـورت گرفتـه اسـت.مدلهای قابل قبولی در شرایط Vitro موجود هستند کـه بررسـی سـریع توانـاییهـای بـالقوۀمیکروارگانیسمهای پروبیوتیکی را ممکن میسازند(51).

در گذشته، بسیاری از نقادان پروبیوتیکها این سوال را مطرح میکردند که آیا گونه هـایپروبیوتیکی درطی عبور از محیط معدی– روده‌ایی زنده میماننـد. امـروزه مـیتـوان مـسائل‌حرکتی باکتریهای پروبیوتیکی از محیط معدی – رودهایی را بوسیلهٔ تکنولوژیهای برپایه DNAمثل تکنیک های PCR 2کنترل نمود. بـسیاری تحقیقـات اسـتفاده از روشهـای مختلفـی مثـل: (GIT (Gastro Intestinal Tractو Polymerase chain reaction تکنیک های میکروبیولوژی کلاسیک – تکنیک های برپایهٔ ELISA – و تکنیک های برپایـه DANدر سطح بالاتر، را تایید کردهاند، که زنده باقی ماندن گونههای پروبیوتیکی بعد از عبور از محیط‌معدی – روده‌ایی را نشان داده اند(61).

میکروارگانیسمهای پروبیوتیکی

میکروارگانیسمهایی که امروزه به عنوان پروبیوتیک استفاده میشوند، به دو گـروه عمـدهٔلاکتوباسیلوسها و بیفیـدوباکتریومهـا تعلـق دارنـد و در برخـی مـوارد منحـصراً از خـانوادهباکتریهـای لاکتیـک (LA) نیـستند و مخمرهـایی چـون ساکارومایـسیس بـولاردی را نیـزدربرمیگیرند. از مطـرحتـرین میکروارگانیـسمهـای پروبیـوتیکی دنیـا عبارتند از:

Lactobacillus , Bifidobacteria , Other LAB , Non- LAB , L.acidophilus , B.animalis E.faecium , B.cereus, L.casei spp casei , B.breve, E.coli L. para casei , B.infantis , S.boulardii , L.reuteri , B.adolescentis , L.rhamnosus , B.lactis , L.salivarius , B.bifidum,

L.plantarum , B.species , L.crispatus , L.bulgaricus

لاکتوباسیلوسها

لاکتوباسیلها باکتریهای +grاسید دوست میلهای شکلاند که از اعصار گذشته بـهطـور سهواً در فرآیندهای تخمیری مورد استفاده بودند. اما امروزه نقـش آنهـا درایـن صـنایع کـاملاًشناختهشده است و در تولید انواع محصولات کاربرد دارند. لازم به ذکراست که این باکتریها از مهمترین اجزاء فلور طبیعـی رودهٔ انـسان و حیـوان‌میباشند. نام این باکتریها(لاکتو) به این علت است که اینها قادرند قند شیر را تغییردهند. اینها بیشتر در مناطقی که غنی از CHO باشد، مثل غشاهای موکـوس انـسان و حیـوان یافت میشوند(51).

بیفیدو باکترها

برای اولین بار در سال 1981در مدفوع نوزادانی که با شیر مادر تغذیه میشدند کـشف‌گردید که این باکتریها در نوزادان تغذیهشده با شیرخشک کمتر وجود دارد و دانشمندان علـت‌مقاومت بیشتر نوزادان تغذیه شده با شیر مادر را به آن نسبت دادند و امروزه ثابت شدهاست کـه بیفیدو باکترها نقش بسیار مهمی را در میان باکتریهای طبیعی رودهای در سرتاسر زندگی دارند.بیفیدوها بیحرکت، بیاسپور و +grو میلـهای شـکلانـد و اغلـب گونـههـا بـه شـدت‌بیهوازیاند.استفاده از سـویههـای مختلـف بیفیـدوباکترها و لاکتوباسـیلوس اسـیدفیلوس در تولیـدفرآورده های تخمیری از اواخر دهه 1970 رایج گشته است که این امر ناشی از ارتقـای دانـش‌طبقه بندی باکتریها

و شناخت محیطزیست آنها بوده است. البته استفاده ازاین باکتریها باآشکارشدن برخی از ویژگیهایشان مثل اسیدیفیکاسیون کم درطی فرآیند نگهداری محصول بعداز تولید و نیز تولید اسیدلاکتیک نو "ال مثبت" بیشتر، در مقایسه با اسید لاکتیک نوع " دی‌منفی" رو به افزایش گذاشته است.

عمدتاً فواید تغذیه‌های پروبیوتیکها در فرآوردههای تخمیری شیری که حاوی‌لاکتوباسیلوسها و بیفیدوباکترها بودهاند بررسی شده است. این فرآوردهها بسته به نوع شیر مورداستفاده و میکروارگانیسمهای اضافه شده به آن و نیز نوع فرآیند بکار رفته در تولید آنها، حاوی ترکیبات شیمیایی مختلفی میباشند. مشخصهٔ اصلی این فرآوردهها در مقایسه با شیر تخمیر نشده،مقدار لاکتوز پایین آنها و محتوای بالای اسیدهای آمینه آزاد و ویتامینهای خاص در آنهامیباشد. بعلاوه آنها حاوی اسید لاکتیک نوع ال مثبت میباشند که بتوسط بیفیدوباکترها در کناراسید استیک تولید میگردد. این مورد از اسیدوز متابولیکی در دوره نوزادان یکساله جلوگیری‌مینماید. علاوه براین اسیدلاکتیک ال مثبتی که در روده جذب میشود به عنوان منبع انرژی مورداستفاده قرار میگیرد بطوریکه در مقایسه با لاکتوز میزان تولید انرژی آن 15 kj/gبه 16kj/g میباشد. (22)

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتر هردو تولید ویتامین k، اسیدفولیک، نیاسین،تیامین، ریبوفلاوین و پیریدوکسین می نمایند. که به آرامی جذب بدن میگردند. ویتامینهای گروهB نمودن این نیاز بدن کمک بزرگی میباشد. با مصرف فرآوردههای تخمیری شیری که حاوی‌بیفیدوباکترها هستند قابلیت دسترسی زیستی به مینرالهایی چون کلسیم، روی، آهن، منیزیم وفسفر افزایش مییابد. دلیل این امر کاهش pH شیره گوارشی است که به یونیزه شدن نمکهای‌معدنی و هضم بهتر پروتئینها کمک می کند.

نایدو[1] همکارانش یک بازنگری جامعی را درمورد اثرات پروبیوتیکها انجام دادهاند این‌بازنگری شامل اطلاعات حاصله در زمینه بررسیهای in vitroو in vivo میباشد. آنها حدود34 آزمایش کلینیکی انسانی را از سال 1961 تا 1989 انجام داده و اینگونه نتیجه گیری کرده اند.که اثرات درمانی این باکتریها مثبت می باشد. به تازگی نیز این موضوع بتوسط گروهی از محققان عنوان گردیده که میتوان برخی از اثرات ویژه سلامت بخشی بعضی از سویه های‌پروبیوتیکی را از نظر علمی ثابت نمود(31).

اثرات درمانی باکتریهای پروبیوتیکمکانیسم تأثیر باکتریهای پروبیوتیک بر ارتقاء سلامتی را به سری مکانیسمهایی مربوط‌میدانند که اعم آنها را میتوان برشمرد:سکنی گزینی و تکثیر رودهای، تنظیم و کنترل فلورمیکروبی روده، تقویت دیوارهٔ مخاطی‌روده، تأثیر بر نفوذپذیری مخاط روده، جلوگیری از چسبندگی پاتوژنها به مخاط روده‌ازطریق چسبیدن به این بافت، غیر فعال کردن میکروارگانیسمهای پاتوژن، پیشگیری و درمان‌اختلالات گوارشی، فعالیت پادزیستی در برابر عوامل بیماریزا ، تنظیم فعالیت آنزیمی باکتریها، جلوگیری از اثرات جنبی درمان با آنتی بیوتیکها ،تغییر پروتیینهای رژیم غذایی، هضم‌مقدماتی پروتئینها ، سنتز ویتامینها ، بهبود جذب کلسیم ، متابولیسم لاکتوزو کاهش عدم‌تحمل لاکتوز در مورد محصولات لبنی ، بهبود قابلیت هضم، ارتقاءارزش تغذیهای فرآورده، جلوگیری از حساسیت و آلرژی، فعالیت کاهش کلسترول خون، بالابردن قدرت سیستم ایمنی‌بدن، اثرات ضد سرطانی کاهش رشد باکتریهای غیرمفید در مجرای

گوارشی‌لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی و گونه های بیفیدو باکتریوم میتوانناداز رشد می‌کروارگـــانی سم‌های نامطلوب که ممکن است در لولـه دسـتگاه گوارشـی وجـود داشـته باشـند،

جلوگیری کنند. فرآوردههای کشت داده شده با این‌م ی‌کروارگـــانی سم‌ها را برای درمان عفونتهـای خفیـف‌بکار میبرند. بسیاری از اسهالهای مسافرتی که به علت ایجاد باکتریهای پاتوژنی مثل E.coli به‌علت شرایط بد بهداشتی ایجاد میگردد با مصرف پروبیوتیکها درمان میگردد زیرا گونـه هـایL.B با تغییر pH روده محیط را برای ادامه فعالیت این باکتریهـای پـاتوژن نـاامن مـی سـازند. مطالعات دیگری نشان داد که م ی‌کروارگـــانی سم‌های پروبیوتیکی در کنترل رشـد م ی‌کروارگـــانی سم‌های غیـر مفیـد دردستگاه گوارشی اثر مفید دارند. یک محصول حاوی لاکتوباسیلوسها در آرژانتین تولید شد کـه‌در کنترل عفونتهای رودهای مفید بوده است. مصرف شیر تخمیری لاکتوباسیلوس کازیی باعث‌کاهش بروز اسهال در بچههایی که در مراکز درمانی)مراقبتی(روزانه فرانسه نگهداری میشوند،شد. مصرف لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس باعث کنترل رشد بیرویه باکتریهای بیماریزای روده دربیماران مبتلا به نارسایی کلیه میگردد. گونههای انتخابی از لاکتوباسیلوس اسـیدوفیلوس باعـث تراوش مواد ضد میکروبی فعال برعلیه هلیکوباکترپیلوری)عامل اصلی زخم معده در انسان(هم‌به صورت in vivo وهم به صورت in vitro شده است. باکتریهای پروبیوتیکی مقـداری اسـیددرطول رشد خود تولید میکنند، زیرا آنها برای به دست آوردن انرژی رشد بـه فراینـد تخمیـرمتکی هستند. با این حال فعالیت ضد باکتریایی آنها به واسطه تولید اسید نیست بلکه آنها موادی‌را به عنوان متابولیت های ثانویه تولید کرده که این مواد برعلیه م ی‌کروارگـــانی سم‌های غیـر مفیـد دسـتگاه‌گوارش عمل مینمایند. برخی از این م ی‌کروارگـــانی سم‌ها مواد شبه آنتی بیوتیکی تولیـد مـیکننـد، کـه بـه باکتریوسینها موسومند که دارای فعالیت ضد باکتریایی برعلیه باکتریهای بیماریزا هستند.به غیر از باکتریوسینها مواد دیگری نیز توسط باکتریهای پروبیوتیکی تولید میشوند. که‌در گزارشها بعنوان مواد کنترلکننده رشد باکتریهای بیماریزای رودهای معرفی شدهاند. ازجمله می توان به یک ترکیب غیر پروتئینی که با وزن مولکولی کـم توسـط لاکتوباسـیلوسهـا تولیـدمیشود. اشاره نمود این ماده برعلیه دامنه وسیعی از باکتریهـای گـرم منفـی و مثبـت فعالیـت‌مینمایند. برخی بررسیها تولید تعدادی از اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه را عامل مهارکنندگی‌رشد م ی‌کروارگـــانی سم‌ها عنوان کردهاند. روترین یک عامل ضد میکروبی تولید شده توسط لاکتوباسـیلوس‌روتری است که فعالیت ضدباکتریایی گستردهای دارد و اخیراً از آن برای مهار رشد میکروارگانیسمهای‌ناخواسته در تولید پنیر در صنایع لبنی استفاده میشود. عملکرد تعداد دیگـری از بـاکتریهـای‌پروبیوتیکی کنترل عفونتهـای رودهای مـیباشـد. بـرای ایـن کـار از لاکتوباسـیلوسهـا یـابیفیدوباکترها نام بردهاند. این م ی‌کروارگـــانی سم ها با اشغال مکانهای

1- Naido

پیوندی بر روی دیواره روده، از هجوم ورشد باکتریهای بیماریزا جلوگیری میکنند. همچنین ممکـن اسـت بـاکتریهـای پروبیـوتیکی‌فعالیتهای محدود کنندهای را برعلیه باکتریهای بیماریزا در دیواره روده داشته باشند. یعنی دربسیاری از موارد ازجمله جذب غذا، به رقابت می پردازند و باعث محروم مانـدن بـاکتریهـای‌پاتوژن نسبت به غذا و در نهایت مرگ آنها میشوند. امروزه ازاین باکتریها در محصولات لبنی‌جهت کمک به کنترل عفونتهای رودهای در انسان به طور گـستردهای در کـشورهای اروپـاییاستفاده میشود.

اثرات ضد سرطانیمکانیسم ضد سرطانی باکتریها هنوز مشخص نشده است. اما تحقیقات گسترده اثرات متابولیک پروبیوتیکها را در تولید SCFA و ویتامین هایی متل فولات را مخصوصاً درجهت کاهش سرطان کلون به اثبات رسانده است. و این خاصیت بیشتر مربوط به Lb.rhamnosus و Lb.plantarum میباشد. اساسیترین علل کاهش سرطانها با مصرف پروبیوتیکها را به تأثیر بازدارندگی آنها بر مواد سرطانزا یا پیش سازهای این مواد، ممانعت از فعالیت باکتریهای مبدلمواد پیشکارسینوژن به کارسینوژن ها، تولید ترکیبات ضد جهشزا، فعالکردن سیستم ایمنیمیزبان و یا کاهش pH روده جهت کاهش فعالیت میکروبی مربوط میدانند. بررسیهای اخیراثرات ضد سرطانی یا ضد جهشزایی تعدادی از باکتریهای آغازگر را که در تولید انواعفرآوردههای تخمیری شیربکار برده میشوند را نشان داده است، بعضی ازاین مطالعات برروی فرآورده هایی بود که حاوی باکتریهای پروبیوتیکی بودند. برای مثال دریک بررسی مصرف ماست در موشهای مبتلا به تومورهای بدخیم باعث توقف گسترش آنها گردید. در مطالعهدیگری که در مورد انسان انجام گرفت، مصرف باکتریهای آغازگرلاکتوباسیلوس کازئی باعثمحدودیت رشد و برگشت تومورهای بدخیم روده پس از عمل جراحی در بیماران گردید.لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونهبولگاریکوس گونه های دیگری هستند که اغلب بعنوان باکتریهای حاوی توانایی)پتانسیل(فعالیتهای ضد سرطانزایی شناخته شدهاند و مکانیسم اصلی آنها محدود کردن رشد باکتریهایغیر مفید است. فعالیت باکتریهای غیر مفید باعث مساعدشدن شرایط روده بزرگ برای رشدتومورهای سرطانی میشود. گونه های پروبیوتیک باعث بهبود سیستم ایمنی بدن میشوند. یکیازاین سیستمها افزایش میزان اینترفرون در بدن میباشد که بیشتر به خاطر وجود باکتریهایلاکتیک است. دریک مطالعه در دانشگاه Boston به 42 مرد سالم به مدت 4 ماه روزانه gr450 ماست پروبیوتیک)دارای L.b اسیدوفیلوس(داده شد، بعد از این مدت میزان اینترفرون آنهاچهار برابر شده بود. اینترفرون ها می توانند سلولهای لنف را فعال سازند و باعث نابودیسلولهای سرطانی میشوند و در بقیه موارد اینترفرونها یا از رشد و تکثیر سلولهای سرطانیجلوگیری مینمایند و یا آنها را بصورت عادی بر میگردانند. یکی دیگر از مکانیسمهای افزایشسیستم ایمنی بدن تولید و ترشح اسیدلینولئیک کونژوگه می باشد که خواص ضدسرطانی دارد واین به توسط Lb.reuteri صورت می پذیرد. یکی از مواد کارسینوژنیک دربدن انسانnیتروزآمینها میباشند که در اثر احیاءآمینهای نوع دوم ایجاد میشوند. پروبیوتیکها با تولیداسیدبوتیریک مانع از تشکیل آنها میشوند و به این ترتیب از ابتلاء به سرطان جلوگیری میکنند.بسیاری از سرطان های رودهای دراثر ترشح آنزیمهای مختلف از پاتوژنهای ساکن روده ایجادمیشوند که باکتریهای پروبیوتیک با غیرفعال ساختن این باکتریها میزان ابتلا به سرطانهایروده ای را کاهش میدهند.

بالابردن قدرت سیستم ایمنی بدن

سیستم گوارش انسان، جزء مکمل سیستم ایمنی است. هرگونه تغییری در محیط روده کهعمدتاً به وسیلهٔ مواد غذایی مصرفی ایجاد میشود، می تواند عملکرد سیستم ایمنی مخاطی راتحتالشعاع قراردهد. تقویت سیستم پاسخ ایمنی بدن پس از مصرف برخی لاکتوباسیلوسهاباعث افزایش مقاومت میزبان به عفونتهای رودهای میگردد. چسبندگی پروبیوتیکها به بافتلنفوئید روده، می تواند باعث تحریک سیستم ایمنی گردد که این تأثیر بسته به گونه پروبیوتیکیمورد استفاده، متفاوت است. ازجمله میتوان به بیفیدوباکتریوم لانگوم اشاره نمود این میکروارگانیسمهاسبب تحریک سیستم ایمنی برای کنترل رشد اشرشیاکلی در دیواره دستگاه گوارش میشود.بررسیهای

بیشتر نشان داده که این فعالیتها شامل فعالسازی ماکروفاژهایی است که سبب‌تخریب دیواره سلولی‌م ی‌کروارگـانی‌سم های بیماریزا در بدن میزبان میشود. مصرف این‌م ی‌کروارگـانی‌سم هـا بـه علـت‌افزایش مکانیسم دفاعی بدن میزبان در کنترل بیماریهای ناشی از مسمومیت غـذایی نیـز مفیـداست.

کنترل سطح کلسترول خونبا آنکه محل اصلی متابولیسم کلسترول در بدن، کبد اسـت، بـا ایـن حـال مقـدار قابـل‌ملاحظه ایی از آن، در روده ها تولید میشود. چندین بررسی برروی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوسهانشان داده که آنها میتوانند باعث کاهش میزان کلسترول خـون در انـسان شـوند. کـاهش pHناشی شده از تولید اسیدلاکتیک توسط باکتریهای لاکتیک موجب ترسیب کلـسترول بـه همـراه‌نمک های صفراوی غیر اشباع و عدم جذب برخـی اسـیدهای صـفراوی در روده شـده و دفـع‌اسیدهای صفراوی ازطریق مدفوع یکی از مکانیسم های اصلی تعادل متابولیسم کلسترول در بدن‌میباشد. یک نوع شیر تخمیری به نام wild که حاوی گونه ای از لاکتوباسیلوس بود به گروهی ازمردان با کلسترول بالا خورانده شد. کاهش سطح کلسترول دراین افراد با مصرف 12 روز از شیرتخمیری یادشده، معنی دار بود. در مطالعه دیگری اسـتفاده از لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس درفرمولاسیون غذای کودک باعث کاهش سطح کلسترول خون شد. بعضی گونههای لاکتوباسیلوس‌اسیدوفیلوس در شرایط آزمایشگاهی میتواند فعالانه کلسترول را در طـول رشـد جـذب کننـددراین حالت بخشی از کلسترول به غشای سلولی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس متصل مـیشـود.لاکتوباسیلوس کازیی و بیفیدوباکتریوم لانگوم نیـز باعـث حـذف کلـسترول از محـیط کـشت‌آزمایشگاهی شده که بسیار شبیه عمل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بوده و سبب الحاق بخشی ازآن در غشای سلولی این باکتری میشود.

بهبود هضم لاکتوز

برخی افراد قابلیت هضم لاکتوز یا قند شیر را ندارند، این مشکل ناشی از کمبـود ترشـح‌آنزیم β-D -گالاکتوزیداز در روده کوچک برای هیدرولیز لاکتوز میباشد. زمانی که ایـن افـرادشیر مصرف می کنند، تخمیر غیرقابل کنترل لاکتوز در روده بـزرگ باعـث بـروز علائمـی چـون‌نفخ،اسهال و دردشکم میگردد. بررسیها نشان داده که باکتریهای آغازگر ماست با تغییر لاکتوزو تبدیل آن به اسیدلاکتیک، مصرف این فرآورده را برای افراد مبتلا به سوء جذب لاکتوز مناسب‌میسازند. شیرهای تخمیری حاوی باکتریهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز برای مصرف افرادمبتلا به عدم تحمل لاکتوز مفیدند. این م ی‌کروارگـانی‌سم ها شبیه استارترهای ماست نیستند و مـیتواننـد دردیواره روده زنده مانده و رشد نمایند.

بهبود جذب کلسیم

یکی از مهمترین مسائل تغذیه عدم دریافت کلی کلسیم میباشد. کلسیم که کلان عنصرموجود در کل فرآوردههای لبنی است، خود یک ماده ممانعت کننده از سرطانها بویژه سرطان91-01 ساله وروده بزرگ میباشد. طبق تحقیقات دانشگاه بوستون تقریباً 90٪ در دختران 70٪از پسران 01–91 ساله نیازهای روزانه کلسیم خود را دریافت نمیدارند و همچنین مطالعات نشان میدهد که با افزایش کلسیم در رژیم غذائی،

دانسیته مواد معدنی استخوانی زیادو به این ترتیب شیوع شکستگیهای استخوانی کم میشود. کاهش pH سیستم گوارش، باعث‌افزایش دسترسی به کلسیم میشود. نکته قابل توجه اینکه مصرف لبنیات حاوی پروبیوتیکها به علت افزایش ICH که یک فاکتور رشد و تشکیل استخوان است، نسبت به مصرف قرصهای‌کلسیم بسیار مفیدتر میباشد.جلوگیری از اثرات جنبی درمان با آنتی بیوتیکهادر بسیاری از بیماریها، آنتی بیوتیکها ضروری میباشد. آنتی بیوتیکها بطور مشخص هم‌باکتریهای مفید و هم پاتوژن را نابود میکنند و اکوسیستم رودهای را تغییر می دهند. پس طـول‌درمان با آنتی بیوتیکها بسیار مهم میباشد. بعنوان مثال، بسیاری از اسهالها مربوط بـه مـصرف‌مداوم آنتی بیوتیکهایی مثل آمپیسیلین میباشد که پروبیوتیکها به سرعت باعث رفع این عارضه‌میشوند. پس پروبیوتیک تراپی بعد از درمان آنتی بیوتیکی بسیار لازم است.

ارتقاء ارزش تغذیهای فرآورده

گونه های پروبیوتیک تولید آنزیمهای مختلفی مینمایند کـه هـضم پـروتئینهـا را آسـان‌مینماید. این باکتریها همچنین سازنده انواع ویتامینهای B، B2، B3، B12 1نیاسین و اسیدفولیک و اسیدپانتوتنیک، اسیدهای آمینه آزاد خاص،مثل متیونین، لیزین و تریپتوفان میباشند.

بهبود قابلیت هضملاکتوباسیلوسها با مکانیسمهای مختلفی باعث تنظیم حرکات رودهای نیز مـیشـوند کـه‌باعث هضم بهتر با درد و نفخ کمتر میشود.

جلوگیری از حساسیتهای پوستی و آلرژی

گونه های پروبیوتیک به خصوص لاکتوباسیلوس از ایجاد آلـرژی در کودکـان جلـوگیری‌میکنند و این بیشتر مربوط به فعالیت Lb.rhamnosusمی باشـد تـا دوسـالگی تقریبـاً 53٪ ازکودکان دچار آلرژی اگزما میشوند که درآن پوست ملتهب میگردد و قرمز میشود. این عارضه‌در کودکانی که پروبیوتیکها را دریافت میدارند بسیار کمتر است. بهمین علت توصیه میشـود تا زنان باردارچند هفته قبل از وضع حمل، پروبیوتیکها را بیشتر مصرف نمایند.ضد افسردگی‌گونه های پروبیوتیکها بهخصوص لاکتوباسیلوسها قادرند تا یک حالت بشاشیت و ضـد افسردگی را در انسان ایجاد نمایند و این بیشتر به خاطر آزادسازی اسیدآمینه تریپتوفان میباشد.

فعالیت پادزیستی در برابر عوامل بیماریزا

یکی از عوارض عمده در بیماران مبتلا به ایدز رشد مخمر کاندیدا آلبیکـانس در مجـاری‌ادراری آنها میباشد که گونههای پروبیوتیک به سرعت آنها را نابود مـیسـازند، همچنـین دردرمان عفونتهای هلیکوباکترپیلوری بسیار موثرند. باتوجه به خصوصیات ذکر شده، زندهبـودن و فعالیـت بـاکتریهـای پروبیوتیـک بـسیارضروری میباشد. باکتری های پروبیوتیک برای زیست و فعالیت بیشتر به موادی بنام پریبیوتیـک‌نیازدارند. پریبیوتیکها، کربوهیدراتهای غیرقابل هضماند که باعث رشد و فعالیت باکتریهـای‌پروبیوتیک میشوند. اینها شامل فروکتوالیگوساکاریدها و اینولین میباشند که به طور طبیعی درمواد غذایی مثل آرتشیو، پیاز، ترهفرنگی و عسل و موز یافت می شوند. این

مواد قادرند تا جذب‌کلسیم را افزایش دهند. به علاوه اینها حرکات رودهای را تنظیم و سـطح T.G و کلـسترول راتنظیم نگاه میدارند.ایجاد سلامتی در انسان‌این واقعیت که باکتریهای پروبیوتیکی میتوانند باعث ارتقاء سـلامتی مـصرف کننـدگان‌شوند یک حقیقت انکارناپذیر است. اما هنوز اطلاعات لازم دراین خصوص تکمیل نشده است وتلاشهای زیادی درجهت شناسایی و کاربرد بیشتر پروبیوتیکها در شیر در جریان است.

پروبیوتیک ها از دیدگاه حقوق مصرف کننده

اتحادیه ی اروپا اخیراً فعالیت های حمایتگرانه ای را برای مشخص کردن نقاط مبهم درمورد غذاهای سلامتی بخش دستگاه گوارش پایه گذاری کرده و رویکرد تکنولوژی برای‌آیندگان را مشخص نموده است.پروبیوتیک ها چه احتیاجاتی را برآورده می سازند؟مفهوم غذا از نظر انسان های امروزی تغییر کرده است. زمانی غذا فقط به عنوان منبع‌انرژی و یا تأمین پروتئین ها و در مرحله ی بعد تأمین ویتامین ها و مواد معدنی مورد توجه بود،ولی امروزه غذا به عنوان وسیله ی ارتقای کارایی بدن دیده می شود.فواید پروبیوتیک ها نیز مرتبط با همین باکتری های روده ای است اما بعد از 51 سال‌مطالعه، فقط تعداد کمی از پروبیوتیک ها به خوبی تشخیص داده شده اند و نقایص زیادی دراطلاعات ما وجود دارد. به صورت علمی تأثیرات سودمند و ایمنی این سویه های خاص‌مشخص شده است.هرچه تأثیر باکتری های روده ای را بر روی سلامت بهتر بشناسیم، شانس بیشتری برای‌ارتقای پروبیوتیک ها وجود دارد.بنابراین بر پایه ی نیازهای جامعه (که توسط مطالعات اپیدمیولوژی شناسایی می شود) باید محصولات جدیدی طراحی شود.پروبیوتیک ها می توانند برای افراد سالم نیز مفید باشند زیرا ریسک بیماری هایی مثل‌اسهال، آلرژی، و احتمالاً سرطان و دیابت را کاهش می دهد. پروبیوتیک های خاص می توانند به منظور کاهش یا جلوگیری از اثرات ثانویه ی دارودرمانی یا جلوگیری از بعضی عفونت ها، گسترش یابند. پروبیوتیک ها می توانند حتی در مورد بیماری های نادر نیز به کار گرفته شوند.پروبیوتیک هایی که به منظور های درمانی به کار گرفته می شود باید دقیقاً از پروبیوتیک هایی‌که در غذاها توسط افراد سالم مصرف می شود، متمایز گردد.

تأثیر پروبیوتیک ها بر اساس سویه به کارگرفته شده و شرایط پروسس تغییر می یابد و ازاین رو ادعای سلامتی بخش بودن پروبیوتیک باید بر اساس فواید محصول نهایی برای مصرف‌کننده بررسی شود. همچنین هر نوع ادعایی باید برای مصرف کننده قابل فهم و اطلاع رسانی‌باشد.از آن جا که مصرف منظم بسیاری از محصولات پروبیوتیک برای اطمینان از تأثیر گذاری‌آن ها پیشنهاد می شود، باید با یک رژیم متعادل سازگار بوده و این تصور را که می توانندجایگزین رژیم متعادل شوند، به مصرف کننده القا نکند.ثابت کردن تمام ادعاهای سلامتی بخش در مورد محصول باید اجباری باشد. همچنین‌قانونگذاری از رخداد وقایع غیر قانونی که اطمینان و حقوق مصرف کننده را زیر پا می گذارد،جلوگیری خواهد کرد.علاوه بر بحث ادعایی که در مورد محصولات می شود، بر چسب موجود بر روی‌محصولات پروبیوتیک باید اطلاعات جامع و لازم را فراهم آورد تا مصرف کننده تمام ویژگی‌های مخصوص به آن محصول را متوجه شود. اطلاعاتی که توسط FAO/WHO در سال 2002 پیشنهاد شده شامل موارد ذیل است:

• خصوصیات باکتری، شامل اسم صحیح آن

• مینیمم تعداد باکتری زنده در مورد هر سویه که در پایان عمر انبار داری محصول باقی‌می ماند.

• میزان مصرف لازم به منظور ایجاد تأثیرات سلامتی بخش• توصیفی در مورد تأثیرات فیزیولوژی ثابت شده در مورد پروبیوتیک• اطلاعاتی در مورد شرایط نگهداری صحیح و طریقه ی مصرف• جزئیات در مورد نحوه ی تماس با تولید کننده

همچنین محصولاتی که برای گروه های خاصی تولید می شوند و بر بقیه ی افراد اثرخاصی ندارند باید به نحوی مشخص شوند.اگر محصول برای گروهی از مردم مانند کسانی که در شرایط مزمن بیماری یاایمونولوژیکی به سر می برند، اثرات منفی دارد، حتماً باید ذکر شود تا از مصرف محصول‌خودداری نمایند.

به علاوه ی بحث اطلاعات کامل که توسط تولید کننده بر روی محصول آورده می شود،باید تلاش هایی به منظور افزایش آگاهی مصرف کننده نسبت به پروبیوتیک ها صورت گیرد.گوناگونی محصولات پروبیوتیک، تأثیرات و محدودیت های آن و اهمیت آن ها نسبت به غذاهای دیگر باید برای مصرف کننده روشن گردد. همچنین مصرف کنندگان باید به اطلاعات‌جزئی بیشتری)علاوه بر آن چه که روی بسته بندی آورده شد) دسترسی داشته باشند. این‌اطلاعات می تواند بر روی وب سایت هایی که توسط تولید کننده طراحی می گردد، آورده‌شود. به علاوه شماره تلفن و آدرس پستی برای تماس مصرف کننده و کسب اطلاعات بایدفراهم گردد.

ایمنی و کارایی پروبیوتیک هاافزایش ایمنی و کارایی باید بخش به بخش مورد توجه قرار گیرد.

1- خصوصیات سویه ی خاص باکتری مورد استفاده

این مورد شامل قابلیت بقای باکتری در محصول و در لوله های گوارشی می باشد همچنین مقاومت به آنتی بیوتیک ها و عدم وجود حالت ویروسی در آن نیز بررسی می شود.

2-مشخص کردن شرایط پروس

خلوص و زنده ماندن سویه باید طی عملیات تولید حفظ شود. حفظ شرایط نگهداری‌اپتیمم نیز ضروری است زیرا باکتری به شرایط دمایی، نور، رطوبت و اکسیژن حساس است.بنابراین شرایط یخچالی برای حفظ فعالیت باکتری لازم است.

3-ماهیت محصول‌تعداد باکتری در محصول باید متناسب با اثر سلامتی بخش ادعا شده باشد. همچنین‌برچسب زنی باید مطابق قوانین وضع شده صورت گیرد. علاوه بر اهمیت کمترین تعداد باکتری‌موجود در محصول که می تواند اثر سلامتی بخش داشته باشد، باید مطمئن شد که تعداد باکتری‌موجود در محصول ایجاد اور دوز نیز نمی کند.در طی دو دهه ی گذشته، پروبیوتیک ها به انواع مختلف مواد غذایی افزوده شده اند.بنابراین مهم است که ماهیت غذاهای حاوی پروبیوتیک مطابق و همسو با یک رژیم متعادل باشد.اطلاعات صحیح در مورد نگهداری و حمل و نقل محصول برای حفظ باکتری ها لازم‌است.

خطرات احتمالی نیز برای بعضی از مصرف کنندگان خاص یا بیماران با بیماری مزمن بایددر نظر گرفته شود. همچنین باید دقت شود که بین غذاهای حاوی پروبیوتیک و محصولات‌دارویی اشتباه رخ ندهد و تبلیغاتی که در مورد پروبیوتیک ها در رسانه ها صورت می گیرد بایددر یک روند هماهنگ قانون مند گردد.فعالیت هایی در رابطه با ایمنی پروبیوتیک ها توسط (European Food Safety Authority) EFSAو ILSI (International Life Science Institute)و EFFCA (European Food and Feed Cultures Association)صورت گرفته است.

تبادل نظر در مورد پروبیوتیک ها

حقیقت این است که بازار پروبیوتیک ها به خاطر استقبال مصرف کنندگان از آن وجوددارد. برای ایجاد اطمینان و اعتماد در مصرف کننده، مکانیزم های ارتباطی و تبادل نظر گسترده‌در این رابطه لازم است. بنابراین احتیاج به نشست هایی برای تبادل اطلاعات و مقایسه تجربیات در بین کشور ها و طرف های متفاوت وجود دارد. هدف از این گفتگوها توانمند سازی‌مصرف کننده برای یک انتخاب آگاهانه و آگاه نمودن صنعت از نیاز مصرف کننده می باشد(11).

ایمنیبحث ایمنی غذاهای سلامتی بخش احتیاج به تحقیقات جامعی دارد. مواد اولیه و پروسس‌های به کار گرفته شده و قابلیت استفاده از آن ها در رژیم غذایی باید مورد بررسی قرار گیرد.اول این که میزان اپتیمم ترکیبات فعال بیولوژیکی در غذاهای عملکردی باید مشخص‌گردد. وقتی که مصرف گسترده ی یک غذای عملکردی و دارای اجزای فعال از نظرفیزیولوژیکی مورد نظر است، باید فواید و خطرات آن برای هر فرد و همینطور برای جامعه درنظر گرفته شود. اطلاع درباره ی سمیت ترکیبات غذاهای عملکردی، برای کاهش نسبت خطر به‌سودمندی آن ضروری است.فواید ادعا شده درباره ی یک محصول باید با ارجاع آن به مطالعات صحیح و اصولی‌توجیه گردد. همین طور تلاش برای تشویق مصرف رژیم غذایی متعادل شامل مصرف ماهی،میوه، سبزیجات و غلات کامل نباید تحت الشعاع مصرف غذاهای کم کیفیت و دارای مکمل‌های عملکردی قرار گیرد. وقتی محصول از نظر تغذیه ای دارای ارزش کمی باشد. همراه سازی‌آن با مکمل های عملکردی باعث القای عادات غذایی ضعیف و نامطلوب به مصرف کننده می‌شود.

در راستای افزایش تعداد محصولات غنی شده، مراقبت برای جلوگیری از دریافت بی‌رویه ترکیبات عملکردی باید صورت پذیرد.مطالعات بیشتر برای اثبات فواید بالقوه ی غذاهای عملکردی که رابطه ی سلامتی بخش‌آن ها به صورت علمی تصدیق نشده، لازم است.

تحقیقات در زمینه ی غذاهای سلامتی بخش فقط هنگامی سلامت عمومی جامعه را ارتقامی بخشد که فواید این نوع غذاها به شکل شفاف و مؤثر به اطلاع مصرف کننده رسانده شود.وقتی ادعاهای سلامتی بخش به روشنی توسط شواهد علمی حمایت شود، اعتماد مصرف کننده‌افزایش می یابد و بنابراین علاوه بر مطالعات حیوانی، تعمیم مطالعات کلینیکی به انسان ها برای‌تضمین ایمنی محصول و اثبات کارایی ترکیبات فعال در آن، ضروری است.

آزمون اثر غذاهای عملکردی

باید امکانات داشتن یک انتخاب سالم برای مصرف کننده فراهم شود.احتیاج به بهبود روش های کلینیکی استاندارد و انعطاف پذیر به شکل invivo و invitroبرای اندازه گیری خصوصیات تغذیه ای غذاها، در جهت منافع مصرف کننده و تولید کنندهوجود دارد. آزمون های کلینیکال مدارک مستدلی را در زمینه ی کارایی و کارآمدی محصولفراهم می سازد. باید پارامترهای مختلف سلامت، تغذیه، متابولیسم بر روی محصول مورد نظر اندازه گیری‌شود.روش دیگر دادن خوراکی پلاسبو و محصول به افراد مورد مطالعه در فازهای مختلف‌آزمایش می باشد. اگر چه قدرت آماری این مطالعات بالاست اما فقط وقتی می تواند استفاده‌شود که اندازه گیری معیار مشخصی مد نظر باشد.برای تأمین کارایی غذاهای عملکردی پروبیوتیک یا پربیوتیک چند شاخص بررسی می‌شود. پیش نیازهای اصلی مانیتور کردن تغییرات کمی و کیفی در جمعیت میکروبی روده است.اما نمونه های مدفوع لزوماً نشان دهنده ی شرایط موجود در روده نیست. مشکل اصلی دیگرتفاوت قائل شدن سویه های پروبیوتیک از سویه های اندوجینوس است. همین طور به علت‌تفاوت های بخش به بخش در فلور میکروبی افراد، پروبیوتیک ها به صورت یکسان در تمام‌افراد عمل نمی کنند.پیشرفت های اخیر در تکنولوژی مولکولی امکان به کارگیری متدهای جدید را به جای‌تکنیک های قدیمی وابسته به محیط کشت که اطلاعات کمتری را حاصل می دهد، امکان پذیرمی باشد.

- کلونینگ و آنالیزهای پلی ژنتیک توالی 16Sr RNA
- هیبریدازسیون سلولی با r RNA فلورسنت
- هیبدریدازسیون دلت- بلات
- تشخیص PCR
- آنالیز پلی مورفیک DNA
- آنالیز با آنزیم محدود کننده
- الکترو فورز در میدان پالسی
- استفاده از ژن لوسیفراز به عنوان بیوسنسور
- با استفاده از وکتورهای منتقل کننده ژن فلورسنت
- 16Sr DNA PCR

چشم انداز قانونیاز آن جا که غذاهای عملکردی تعریف قانونی ندارند، هیچ آیین فاقد مستقیمی در رابطه باآن وجود ندارد. از این جهت برای این که محصول جدید به عنوان غذا، مکمل یا دارو لیبل زده‌شود، ابهام وجود دارد. از آن جا که قانون گذاری برای هر یک از این موارد به شکل متفاوتی‌صورت می گیرد، برای هر دارو یا غذای جدیدی، مجوز FDA احتیاج است، در حالی که مکمل‌های غذایی از حساسیت کمتری در قانون گذاری برخوردار است(9).

ایمنی پروبیوتیک هاطبقه بندیارزیابی ایمنی فاز مشکل ولی ضروری در توسعه ی هر غذای جدیدی می باشد. به‌خصوص این ارزیابی هنگامی که با میکرو ارگانیزم ها که شمال پروبیوتیک ها هم می باشند سرو کار داریم بسیار حائز اهمیت است چون درمیکروبیولوژی در هیچ موردی احتمال وجود خطرصفر نمی باشد.

اولین قدم در ارزیابی ایمنی پروبیوتیک ها شناسایی مناسب نوع و گونه های پروبیوتیک‌می باشد. که این کار پروبیوتیک را در سطح طبقه بندی مناسبی قرار می دهد که اجازه ی تثبیت‌مقدماتی فاکتورهای خطر در رابطه با این گونه از پروبیوتیک را با مراجعه به اطلاعات مربوط

به‌این بخش از سطح طبقه بندی را می دهد.علاوه بر این در محصول پروبیوتیک قابل اعتماد باید گونه های پروبیوتیک استفاده شده‌در آن به طور صحیح مشخص شود و بر روی برچسب محصول نوشته شود.روش شناسایی و برچسب زنی نادرست محصولات نیز قابل قبول می باشد. برچسب زنی‌نادرست امکان دارد که مشکلات ایمنی جدی را سبب شود(61).

مطالعاتی در زمینه ایمنی پروبیوتیک ها برای سنجش ایمنی یک نژاد پروبیوتیکاز چهار روش می توان استفاده نمود:**مطالعه بر روی خواص طبیعی نژاد**مطالعه بر روی pharmacokinetics نژاد)بقاء، فعالیت در روده، ارتباطات

مطالعه ی تحقیقی بر روی نوع رابطه ی بین نژاد و میزبانبه طور کلی برای پیش بینی اثرات مثبت و همچنین اثرات جانبی پروبیوتیک ها داشتن‌بقایای پروبیوتیک ها در دستگاه گوارش، انتقال و خواص colonization و سرانجام پروبیوتیک‌های بلعیده شده الزامی می باشد.اما در مورد بقاء پروبیوتیک ها در دستگاه کوارش بین نژاد های مختلف تفاوت وجوددارد مثلاً بعضی از نژاد ها به سرعت در معده کشته می شوند در حالی که بعضی از نژادها مانندنژاد های بیفدوباکتری ها یا لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می توانند با غلظت های میل بالا از تمام‌مجاری روده و شکم عبور نمایند. در این زمینه می توان اشاره کرد که بیشتر از تأثیر شرایط معده‌بر روی پروبیوتیک ها حفاظت می نمایند.البته باید متذکر شد که به طور کلی تعیین حداقل دز پروبیوتیک از نظر ایجاد عفونت‌کاری بسیار مشکل است چون به تعداد زیادی از عوامل میکروبی در میزبان نیاز دارد.

inVitro و مطالعات بر روی حیوانات

این اعتقاد وجود دارد که نژادهای پروبیوتیک نباید به سلول های میزبان حمله کنند وآسیبی برسانند اما در صورت حمل ظرفیت تهاجم یک نژاد با شمارش سلول های کشته شده وآسیب دیده ی روده محاسبه می شود و برای تعیین ظرفیت تهاجم از مدلهای حیوانی استفاده می‌گردد و چون نوسانات زیادی در این محاسبات در مدل حیوانی وجود دارد باعث استنباط این‌نتایج در مورد انسان نمی شود.مطالعه بر روی داوطلبان سالم و آزمایش کلینیکی‌برای نشان دادن ایمنی پروبیوتیک ها از آزمایشات کلینیک کوتاه مدت داوطلبان سالم‌استفاده می شود و بیشتر این مطالعات بیان میکنند اثرات جانبی پروبیوتیک ها بیشتر از اثر مثبت‌آن ها نمی باشد و به طور کلی عملکرد پروبیوتیک ها خوب معرفی شده است.

مراقبت اپیدمیولوژی

تا امروز، تاریخ طولانی استفاده ی پروبیوتیک ها از لحاظ ایمنی بهترین دلیل ایمنی آن‌هاست و چون خطر نا امن بودن هر پروبیوتیک خیلی کم است بنابراین برای بررسی پروبیوتیک‌ها از این جهت از روش های آنالیزی مطلاهات اپیدمیولوژی و روش phatmacovigilanceاستفاده می شود.

اثرات نامطلوب پروبیوتیک ها از لحاظ تئوری

از لحاظ تئوری پروبیوتیک ها میکرو ارگانیزم های زنده ای هستند که ممکن است باعث‌چهار نوع اثر جانبی شوند:

• عفونت های عمومی• خطر فعالیت های متابولیکی مخرب

• خطر اثر جانبی adjuvant و immunomodulation• خطر انتقال ژن

اثرات آنزیمی و متابولیکی

هنگامی که روده ی کوچک به تعداد زیادی از میکروارگانیزم ها آلوده می شوند باعث‌اسهال و زخم های روده ای، به خصوص باعث de conjugationو de hydroxylation نمک‌های صفراوی می شود.به طور متداول در این مطالعات تأثیر پروبیوتیک های دارای فعالیت شدید هیدرولاز برروی نمک های صفراوی)de conjugation) مورد بررسی قرار می گیرد.همچنین تجزیه ی شدید لایه موکوس روده به وسیله ی پروبیوتیک ها از نظر تئوری مضرند که این امر به وسیله ی بعضی از باکتری های endogenous شامل لاکتوباسیلوس ها و بعضی‌از نژادهای bacteroiles انجام می شود.

اثرات ایمونولوژی

خوردن دزهای بالا باکتری های اسید لاکتیک (LAB) به وسیله ی موش ها با عث اثرات‌جانبی ایمونولوژی در آن ها نمی گردد.تا آن جا که معلوماتمان اجازه می دهد هیچ اثر جانبی ایمونولوژی از پروبیوتیک ها درانسان گزارش نشده است(22).

1- ارزیابی ایمنی ارزیابی فاکتورهای خطر در محیط غیر زنده‌برای ارزیابی ایمنی یک گونه ی جدید یا موجود از میکروارگانیزم در محیط Vitroباید بدانیم که چه مشخصه هایی را می توانیم مشخصه ی خطر برای آن میکرو ارگانیزم درنظر بگیریم.-

2- محصولات پایانی متابولیسم‌فعالیت متابولیکی هم می تواند برای ارزیابی ایمنی محصولات پروبیوتیک به کار برده‌شود. به خصوص تولید D- لاکتیک اسید و همچنین آمین های بیوژن می تواند فاکتور خطر درنظر گرفته می شود.

3- مقاومت ضد میکروبی‌مهمترین فاکتور خطری که در حالت vitro می تواند مورد ارزیابی قرار گیرد مقاومت‌آنتی بیوتیکی قابل انتقال می باشد. مقاومت آنتی بیوتیکی معمول در میان میکروب ها استارترهای‌لبنی و پروبیوتیک ها از این مورد مستثنی نیست.

دلیل این است که آنتی بیوتیک ها عملکردهای‌خاصی را در سلول میکروبی مورد هدف قرار میدهند و حتی آنتی بیوتیک های با طیف گسترده‌عملکردی نمی توانند تمامی میکروب ها را تحت تأثیر قرار دهند برای این که میکروب هاخصوصیات مقاومتی ذاتی را دارا می باشند.

4- ارزیابی فاکتورهای خطر در محیط زنده‌مدل های حیوانی آزمایشی گوناگونی به طور وسیع برای ارزیابی تأثیر پروبیوتیک بر روی‌میزبان به کاربرده می شوند و اغلب انسان ها و حیوانات رفتار مشابهی را در مقابل پروبیوتیک هااز خود نشان می دهند.

5- ارزیابی فاکتورهای خطر از طریق ژنوم‌در تعداد زیادی از میکروب ها که توالی شان شناسایی شده است ژنوم برای شناسایی‌فاکتورهای خطر به کار برده می شود و این کار در مورد ژنوم L. acidophilus NCEMصورت گرفته است و هیچ مقاومت آنتی بیوتیکی قابل انتقالی شناسایی نشده است و این کار درمورد دیگر گونه های پروبیوتیک ها نیز می تواند انجام بگیرد.

6- نقش میزبان‌در هر عفونتی دو عامل میکروب و میزبان درگیر می باشند که در موارد قبلی خمش‌میکروب را بررسی کردیم و بررسی نقش میزبان نیز حائز اهمیت است.

طبقه بندی ارگانیزم های ایمن

اولین طبقه بندی در مورد ایمنی میکروب ها که شامل باکتری های لاکتیک اسید نیز می‌شد توسط اتحادیه ی آلمان ها برای صنایع شیمیایی صورت گرفت و هدف از تهیه ی این لیست‌ارزیابی ایمنی کارگرانی بود که در زمینه ی بیوتکنولوژی کار می کردند که بیش از مصرف‌کنندگان با باکتری ها سر و کار داشتند. ولی اهمیت این لیست برای عموم بحث برانگیز است.فدراسیون بین المللی لبنیات European Food and Feed Cultures Associationلیستی‌از میکروارگانیزم ها را گردآوری کرده است که استناداً در مواد فرای مورد استفاده قرار گرفته انداین لیست ایمنی این میکروارگانیزم ها را ضمانت نمی کند ولی می تواند به عنوان بیانگر ایمنی‌استفاده از این میکروارگانیزم ها می باشد.در آمریکا تولید کننده می تواند)Generally Recognized As Safe Status (GRASرااجرا کند که از طرف اداره ی کل غذا و داروی آمریکا وضع شده است.برای مثال GRAS اجازه ی استفاده از باکتری های L.bulgaricus و S. thermophilusدر فرآوری ماست وجود دارد.سیستم های مشابهی با GRAS در اروپا وجود دارد به نام)European Food Safety Agency (EFSA یا آژانس ایمنی غذا که هدف آن توسعه ی QPS یا) Presumption of Safety Qualified) برای میکروارگانیزم های خاص یا گروهی از میکروارگانیزم ها می‌باشد. امکان دسترسی به مراحل ارزیابی ایمنی خاصی را می دهد که در مورد جنس، گونه یاسویه بسته به میکروارگانیزم قابل انجام است(61).

نتایج زیر اغلب بر پایه ی قوانین پایه ریزی شده در استاندارد ها و راهنمایی هایی روی‌غذا و نشانه گذاری غذا، بر اساس کدکس alimentariusدر سال1999می باشد.متخصصان به روز، در علوم میکروبیولوژی، تغذیه ای و تکنولوژی غذایی، معیار روشنی‌را برای رشته

های باکتریایی پروبیوتیکی، مواد غذایی پریبیوتیک، و محصولات شامل رشته های‌باکتریایی پروبیوتیک یا مواد غذایی پروبیوتیک، مشخص کرده اند. این معیار پیشرفت کرده اماهنوز چاپ نشده است.

تغییرات آزمایشگاهی یا کلینیکی که نیاز فرضی به مشخص کردن خصوصیات پری وپروبیوتیک یک غذا دارند، باید تعریف شوند. مقالات علمی مفصل از این سرفصل حذف می‌شود.این قبیل معیارها بهتر است که بر اساس احتیاجات در حال پایه ریزی، برای استفاده ازقوانین پریبیوتیک و پروبیوک باشد. احتیاجات می تواند به وسیله ی افراد مسئول ملی یا بین‌المللی پایه گذاری شود.استفاده ی تعریف شده ی مشخص از این قوانین، بر پایه ی معیار قابل کنترل، اعتبارمصرف کننده ی محصولات را افزایش خواهد داد و مسئولین را قادر به کنترل می کند.محصولات پریبیوتیک و پروبیوتیک تصدیق شده می توانند با ادعاهایی به عنوان‌عملکردشان در تعادل باکتریایی کلونی مصرف کننده و سلامتی روبه بهبود حاصل، پایه گذاری‌شوند و به عنوان قسمتی از رژیم سالم، اثر نمایند.ادعایی که مستقیماً مربوط به مصرف پروبیوتیک ها یا پریبیوتیک می شود و منجر به‌بیماری می گردد، ممنوع است. تصمیم های چون، اجازه به کاهش ادعاهای ریسک بیماری، درحال حاضر، بر پایه های ملی می باشد.کاربرد برای تصویب ادعاهای مربوط به بیماری، به مدرک روشن تجربی نیاز خواهد داشت و بنابراین محصول را به غذایی برای مصارف رژیمی به خصوص تبدیل می کند(7).

پیشنهادات

1- پیشنهادات ما راهی برای ارزیابی آنها و اطمینان از سلامت باکتریها پروبیوتیک جدیدراپیشنهاد می کند.

تولیدکنندهای که مواد غذاییی تهیه می کند مسئولیت نهایی تهیه مواد غذایی سالم را به عهده دارد و مواد غذایی پروبیوتیک باید به اندازه غذاهای دیگر سالم باشند.

2- زمانی که به نظر می رسد ماده غذایی پروبیوتیک یک غذای جدید می باشد از این پس‌باید طبق تاییدیه قانون EU (که برای ذاهای جدید تصویب شده است) باشد.

3- زمانی که یک غذای پروبیوتیک یک تاریخچه مصرف سالم طولانی داشته باشد بعنوان‌یک غذای سالم می باشد و یک ماده غذایی جدید نمی باشد.

4- بهترین تست برای سلامت غذا یک تاریخچه مستند خوب از مصرف انسانی می‌باشد.بنابراین زمانی که یک نوع متعلق به گونه هایی باشد که برایĤنها هیچگونه پاتوژنی شناخته‌نشده است و ازطرفی برای آن گونه های دیگری توصیف شده است که تاریخچه مصرف سالم طولانی دارنداحتمالا بعنوان نوع غذای پروبیوتیک سالم می باشد و یک غذای جدید نمی باشد.

5- زمانی که یک STRAIN به گونه هایی متعلق باشند که برای آن هیچ strain پاتوژنی‌شناخته نشده باشد اما تاریخچه مصرف سالم نداشته باشد ممکن است به عنوان یک پروبیوتیک‌سالم باشد اما باید به عنوان غذایی جدید در نظر گرفته شود و سلامت آن چک شود.

6- وقتی یک strain جدید متعلق به گونه هایی باشد که برای آن strain پاتوژنیک‌شناخته شده است ، یک غذای جدید خواهد بود.

7- وضعیت مناسب طبقه بندی که یک نوع پروبیوتیک را توصیف می کند لازم‌است.امروزه این شامل هیبریداسیون DNA-DNA و تعیین توالی RNA می شود . این دلایل‌بخصوص برای جهشهای یک نوع پروبیوتیک بکار می رود

8- همتراز توصیه 1 رده هایی که حامل ژنهای مقاوم آنتی بیوتیک قابل انتقال هستند ،برای مثال ژنهای حاوی پروتئنهایی که آنتی بیوتیک را غیر فعال میکنند نباید خریداری شوند.

9- رده هایی که بطور مناسب طبقه بندی نشده اند با استفاده از شیوه هایی که در موردتوصیه 7 ذکر شد توصیف می شوند. این رده ها در مجموعه کشت شناسایی شده بین المللی‌نباید قرار داده شوند

نتیجه گیریبرای موفقیت آمیزبودن عمل باکتریهای پروبیوتیکی میبایستی آنها را براساس توانـایی‌فراهم آوردن شرایط مناسب در میزبان ارزیابی کرد. اگر محصولات شیری تخمیری را به عنـوان‌یک غذای مفید در فراهم آوردن نیازهای تغذیهای و ارتقای سلامتی برای مـصرفکننـده مفیـدبدانیم، نیاز به تغییر اساسی در انتخاب باکتریهای اسیدلاکتیکی تجاری میباشد. درایـن حالـت‌استارترها نه تنها براساس تواناییشان در تولید خواص مطلوب ارگـانولپتیکی در فـرآوردههـای‌تخمیری بلکه باید همزمان دارای پتانسیل ارتقای سلامتی در مصرفکننده باشند. یـک نمونـه ازاین نوع، ماستی است که علاوه بر باکتریهای اختصاصی ماست)لاکتوباسیلوس بولگاریکوس واستریپتوکوکوس ترموفیلوس(با باکتریهای پروبیوتیکی ماننـد لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس وگونه های بیفیدوباکتریوم غنی شده است. این دسته از غـذاها امـروزه در دسـته بنـدی غـذاهای‌ارتقاءدهنده سلامتی قراردارند. باتوجه به استقبال شدید مصرفکنندگان ازاین فرآوردهها در بازار اروپایی که به اطلاعرسانی و تبلیغات مناسب همراه بوده است می توان انتظارداشت تولیـد ایـن‌فرآوردهها در بازار کشورهای درحال توسعه هم با استقبال مواجه شود. ضمناً تولید صنعتی ایـن‌فرآورده افزایش هزینه بالایی را در بر نداشته و فناوری موجود در اغلب کارخانه های شیری نیزبرای تولید بخش عظیمی از این فرآوردهها کافی است.به علاوه پایه ی علمی برای تعریف دستگاه گوارش سالم و میکروب های موجود در آن وتأثیر پروبیوتیک ها بر روی آن لازم است.جایگاه ویژه ای برای افزایش سلامت دستگاه گوارش بر روده ها وجود دارد و محصولات‌جدید باید این مهم را مد نظر قرار دهند و پروبیوتیک ها باید به منظور کاهش ریسک بیماری هاتولید شوند. به علاوه پروبیوتیک هایی که برای مصارف پزشکی تولید می شوند بایـد بـه طـوردقیق از آن ها یی که برای افراد سالم و عادی تولید می شوند، تفکیک گردد.تمام ادعاهای سلامتی بخش محصول باید به صورت علمی ثابت شود. همچنین این اثرات‌سلامتی بخش باید برای مصرف کننده قابل فهم و رسا باشد.ثابت کردن تمام اثرات سلامتی بخش محصول قبل از تولید باید اجباری باشد. اطلاعـات‌موجود

بر روی لیبل باید مطابق طرح پیشنهادی FAO/WHO بوده و اطلاعـات مـصرف کننـده‌نسبت به محصول را افزایش دهند.به جنبه های ایمنی محصول باید در هر مورد توجه شـود. کـه شـامل سـویه ی خـاص،خصوصیات پروسه ی تولید و ماهیت محصول می باشد. کمترین و بیشترین حـد مجـاز تعـدادباکتری موجود در محصول نیز باید مشخص گردد.خطرات احتمالی برای گروه های خاص باید در نظر گرفته شود. همچنین پروبیوتیـک هـاباید تحت مطالعات کنترلی صحیح قرار گیرند تا مناسب بودن آن ها برای افراد مبتلا به بیمـاری‌های سخت تخمین زده شود. اطلاعات صحیحی در مـورد شـرایط نگهـداری و حمـل و نقـل‌محصول برای حفظ کارایی آن لازم است. باید روش های پیشرفته برای اطمینـان از گفتگوهـای‌آزادبین مصرف کننده و بخش صنعت، پایه گذاری شود.

منابع

1. Collado, M. C., J. Meriluoto, and S. Salminen. 2007. Role of commercialprobiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus.Lett.Appl.Microbiol.45:454-460.
2. Cross, M. L. 2002. Immunoregulation by probiotic lactobacilli: pro-Th1 signals and their relevance to human health. Clin. Applied Immunol. Rev. 3:115–125.
3. Gomes, M. P., Malcata, F. X. 1999. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in food science & Technology. 10:139-157.
4. Gonzalez, S., Ambrosini, V. M., Nadra, M., Holgado, A. P., Soliver, G. 1994.Acetaldehyde production by strains used as probiotic in fermented milks. J. Food Protection. 57(5):436-440.
5. Hammes, W. P., & Hertel, Ch. 2002. Research approaches for pre-and probiotics: challenges and outlook. Food Research International. 35:165-170.
6. Hildegard prezyrembel, am j clin nutr - 2001 - consideration of possible legislation within existing regulatory frameworks.
7. Huis in'sveld, J. and Harenaar, R. 1991. Probiotics and Health in Man and Animal. J. Chemistry Technology and Biotechnology. 51:562-567.
8. Ioann is S. Arvanitoyannis and Maria va Hovwelingen – koukaliaroglou – 2005– Functional foods: A Survey of Health Claims, pros and cons, and current legislation.
9. Kailasapathy, K., & Supriadi, D. 1996. Effect of whey protein concentrate on the survival of lactobacillus acidophilus in lactose hydrolysed yoghurt during refrigerated storage. Milchwissenschaft. 51(10):565-568.
10. Liisa Lahteenmaki and Aat M. Ledeboer – 2006 – Probiotics – The consumer perspective.
11. Lilly, D. and Stillwell. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. Science.147:747-748.
12. Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Joliret, P., Corrieu, G., 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with protein hydrolysotes. Int. Dairy J. 14:47-53.
13. Mary Ellen Sanders & Joshuis – 1999 – Bringing a Probiotic containing functional food to the market: microbiology product, regulatory and labeling issues.
14. Miguel Gueimonde, Rafael Frias & Arthur C. Ouwehand – 2006 – Assuring the Continued Safety of Lactic acid Bacteria Used as Probiotics.
15. Ohandan, R. C. 1999. Enhancing market value of milk by adding cultures. J.Dairy Science. 32:2245-2256.
16. Robinson, R. K. 1991. Therapeutic properties of fermented milks. Elsevier ،London
17. Salminen, S., Bouley, G., Boutron-Ruavlt, M. C., Cummings, J., Franck, A ،.Gibson, G., Isolaavi, E., Morear, M. C., Roberforid, M. 1998. Functinal food science and Gastroin testinal physiology and function. Brit. J. Nutr. 80:147-171.
18. Sarrela, M., Mogensen, G., Fonden, E., & Sandholm, T. M. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. Biotechnology. 84:197-215.
19. Saxelin, M., Grenov, B., Srensson, U., Fonden, R., & Mattila-Sandholm, T.1999 .The technology of probiotics. Trends in food science & Technology. Elsevier.10:378-392.
20. Seppo Salminen , Atte von Wright, Lorenzo Morelli, Philippe Marteau Dominique Brassart, Willem M. de Vos,

Rangne Fonden, maija Saxelin, Kevin Collins, Gunnar Mogensen, Stein-Erik Birkeland, Tiina Mattila-Sandholm – 1998 –Demonstration of Safety of Probiotics.
21. Shortt, C. 1999. The probiotic century ; historical and current perspectives.Trends in Food Science and Technology. 10:411-417
22. Uller, R.J. 1989. Probiotics in Man and Animals. Appl. Bacteriology. 66:365-378.
23. Ziemer. C. J., & Gibson, G. R. 1998. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. IntDairy J. 8:473-479.

عنوان : کاربرد پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های آن در زمینه‌های مختلف

روحا- کسرای کرمانشاهی

واژه پروبیوتیک کلمه‌ای یونانی است و به معنای «برای زندگی» می‌باشد. این واژه نخستین بار در سال 1965 توسط Lilley و Still well برای مواد مترشحه توسط میکروارگانیسم‌هایی به کار گرفته شد که موجب تحریک رشد در میکروارگانیسم‌های دیگر می‌شوند.

Metchnikoff که در انستیتوپاستور پاریس کار می‌کرد برای اولین بار تأثیرات سودمند شیر تخمیر شده را بیان کرد. تعاریف گوناگونی برای پروبیوتیک‌ها صورت گرفته است و آخرین تعریف توسط کارشناسان FAO/W.H.O در سال 2002 انجام یافت و پروبیوتیک‌ها را اینگونه تعریف نمودند:

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن اساساً (روده، دهان، واژن، دستگاه تنفس و مجرای ادراری) از طریق خوراکی یا به کارگذاری موضعی با حفظ و بهبود توازن فلورمیکروبی، سبب ایجاد خواص سلامت‌بخش برای میزبان می‌شوند و باید به میزان کافی به کار روند و در مقادیر مناسب بر حسب کاربردشان استفاده شوند (1).

مثلاً به عنوان دارو باید مقادیر مصرف $\geq 10^{10}$ واحد لاکتوباسیل باشد و دو بار یا بیشتر در روز به بیماران داده شود و یا برای علوفه سیلو شده به عنوان محافظت از فساد میزان پروبیوتیک بکار رفته باید 10^5باکتری در هر گرم علوفه باشد در حقیقت برای بکارگیری پروبیوتیک به دو جنبه آن باید توجه شود : یکی ارگانیسم باید زنده باشد و دوم اینکه در مقادیر کافی و مناسب وجود داشته باشد. امروزه بیش از 90 فرآورده پروبیوتیکی در سراسر جهان تولید می‌شود و پرمصرف‌ترین آنها در محصولات تخمیری شیر و ماست می‌باشد. همچنین فرآورده‌های پروبیوتیکی به صورت قرص و کپسول برای درمان بیماری‌های گوناگون نظیر: عفونت‌های روده‌ای، انواع اسهال، عفونت دستگاه تناسلی زنان، یبوست، ناسازگاری لاکتوز و غیره در دسترس می‌باشند. همچنین نیز در غذای حیوانات مانند علوفه‌ی سیلو شده دام، غذای طیور و زنبورعسل و آبزیان کاربرد دارند. تعدادی از معیارهایی که برای انتخاب یک میکروارگانیسم به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود عبارتند از :

1- بر حسب مورد استفاده منشاء آن انتخاب شود یعنی یک پروبیوتیک برای انسان باید منشاء انسانی و برای حیوان منشاء حیوانی باید داشته باشد.

2- غیر بیماری‌زا

3- مقاوم بودن به مراحل آماده‌سازی و پایداری و مقاومت در اسید معده و ترشحات صفرا

4- توانایی چسبیدن به سلول‌های اپی اتلیال

5- توانایی باقی ماندن در مجاری روده‌ای و معدی از طریق تولید pH اسیدی، ترکیبات ضد میکروبی، حذف رقابتی باکتری‌های بیماری‌زا یا کاهش آنها در روده

6- توانایی تأثیرگذاری بر فعالیت‌های متابولیکی محلی بر حسب زیستگاه

از نظر عملی، فرآورده‌های پروبیوتیکی باید عمر مناسب داشته و در زمان مصرف حاوی تعداد زیادی سلول‌های زنده و غیر بیماری‌زا و غیر سمی نیز باشند (2).

بطور کلی پروبیوتیک‌ها اکثریت در 7 گروه طبقه‌بندی می‌شوند که شامل :

1- باکتری‌های اسید لاکتیک لاکتوکوکسی

2- لاکتوباسیل‌ها

3- بیفید و باکتری‌ها

4- سایر باکتری‌های اسید لاکتیک (پدیوکوکوس پنتوزاموس و آنتروکوکوس فسیوم)

5- سایر باکتری‌های گرم مثبت مثل (استرپتوکوکوس ترموفیلوس)

6- سایر باکتری‌ها (گرم منفی) مثل (اشیرشیاکلی)

7- مخمر ساکارومیس سرویژیه زیر گونه بولاردی

مهمتین این گروه‌ها باکتری‌های مولد اسید لاکتیک می‌باشد که باکتری‌هایی گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز منفی بوده و فاقد سیتوکروم‌ها هستند و تحمل‌کننده هوا یا بی‌هوازی می‌باشند. از نظر نیازهای غذایی مشکل پسند بوده و مقاوم به اسید هستند و دارای قدرت زیاد تخمیر می‌باشند (3).

از نظر مورفولوژی و فنوتیپ باکتری‌های مولد اسید لاکتیک (L.A.B) به جنس‌های گوناگونی تقسیم شده‌اند : لاکتوباسیلوس، استرپتوکوکوس، آنتروکوکوس، پدیوکوکوس، واگوکوکوس و غیره.

گونه‌های پروبیوتیکی در جنس لاکتوباسیلوس وجود دارد که یکی از گونه‌های آن لاکتوباسیلوس اسید و فیلوس است که بر اثر مطالعات به روش دو رگه‌سازی DNA-DNA در سال 1980،مشخص شد که هتروژنی بین سویه‌های آن وجود دارد، در نتیجه فقط سویه‌هایی که متعلق به گروهی که توافق زیادی با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را دارا بودند در این گونه باقی ماندند، در حالی که اعضای گروه‌های دیگر به گونه‌های مجزایی طبقه‌بندی شدند. برای مثال : *L.gasseri*، *L.cripatus*، *L.gallinarum*، *L.amylovorous* و *L.johansonii* ولی به دلیل نزدیکی زیاد همه‌ی این گونه‌ها در یک گروه معروف به اسیدوفیلوس‌ها جای گرفته‌اند (4و3).

حال به شرح مختصری از تحقیقات انجام شده توسط مؤلف (کرمانشاهی) و همکاران در به کارگیری پروبیوتیک‌ها (تعدادی از باکتری‌های اسید لاکتیک) و متابولیت‌های آنها در زمینه‌های مختلف پرداخته می‌شود:

از آنجایی که باکتری‌های مولد اسید لاکتیک دارای ژنوم نسبتاً کوچکی بوده که این امر علت تطبیق آنها در محیط‌های زیست غنی از مواد غذایی مانند شیر و دستگاه معدی– روده‌ای انسان می‌باشند. بنابراین در زمینه‌های مختلف دارای کاربرد هستند که به عنوان پروبیوتیکها استفاده می‌شوند، شامل جنس‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدو باکتریا و آنتروکوکوس می‌باشند.

در پژوهش‌های انجام شده بر حسب مورد از گونه‌های جنس لاکتوباسیلوس، آنتروکوکوس و لاکتوکوکوس لاکتیس و یا متابولیت‌های آنها مانند باکتریوسین‌ها، بیوسورفکتانت‌ها استفاده شد. زمینه‌های مورد بررسی شامل:

1- بکارگیری پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های آنها در مواد غذایی : غذای انسان مانند مواد لبنی، غذای دام (علوفه سیلو شده)، تغذیه زنبورعسل با شربت شکر به همراه پروبیوتیک، و در کنترل تشکیل بیوفیلم در طی تولید و فرآیند بسته‌بندی مواد غذایی، غذای طیور.

2- محیط زیست : بکارگیری پروبیوتیک‌ها برای مقابله با باکتری‌های پاتوژن و مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های موجود در پساب مراکز پرورش طیور.

3- دندان‌پزشکی : برای جلوگیری از تشکیل پلاک دندانی و تأثیر بر روی باکتری‌های عامل پلاک دندانی و پوسیدگی آن.

4- تولید نانو ساختار لایه سطحی و بهینه‌سازی شرایط تولید آن در باکتری پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC4356.

در ادامه به بررسی کارهای انجام شده در هر یک از این زمینه‌ها پرداخته می‌شود :

در پژوهشی که توسط کرمانشاهی، میرحسینی و همکاران در سال 2006 انجام شد از مواد لبنی باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس مولد باکتریوسین جداسازی شد.

باکتریوسین جدا شده تنها در خاصیت پایداری در pH اسیدی نیسین فرق داشت. برای شناسایی بیشتر، PCR با پرایمرهای اختصاصی $nisR_1$ و $nisR_2$ و پرایمرهای کنترل برای ژن 16srRNA انجام شد. نتایج مثبت برای ژن کنترل مشاهده شد. اثر مهاری باکتریوسین جدید بر روی باسیلوس سرئوس و لیستریامنوسیتوژنز دو باکتری که باعث مسمویت غذایی در غذاهای تخمیر شده می‌باشند، نشان داد. و از آنجایی که در گزارش‌های قبلی نشان داده شده بود که می‌توان از نیسین به عنوان محافظ در مواد غذایی استفاده نمود، از این باکتریوسین جدید هم که شباهت زیادی به نیسین دارد می‌توان در این راستا بهره گرفت (5).

در سال 1385 و 1386 نصر و کرمانشاهی و همکاران اثر نیسین را بر روی باکتری باسیلوس سرئوس مقاوم به برخی از مواد نگهدارنده در پنیر بررسی نموده و نشان دادند که به کارگیری توأم اسید سیتریک و سوربات پتاسیم اثر افزایشی دارد. و باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر نسبت به غلظت‌های کمتر از MIC مواد نگهدارنده مختلف مقاومت نشان می‌دهد و به همین دلیل پیشنهاد می‌شود از کاربرد غلظت‌های کمتر از MIC اجتناب شود (7و6).

در ادامه این پژوهش کارایی نیسین بر روی باکتری لیستریامنوسیتوژنز مقاوم جدا شده از شیر نیز بررسی شد و مشخص شد که سویه‌های جدا شده از این باکتری در این مطالعه مقاومت بالاتری نسبت به سویه‌های گزارش شده به نیسین را نشان داد. و همچنین مقاومت سویه لیستریامنوسیتوژنز مزبور به مواد محافظ دیگر مانند بنزوات سدیم و اسید سوربیک، سوربات پتاسیم، سیترات سدیم و اسید بنزوئیک بررسی و میزان MIC آنها تعیین گردید که نسبت به آنها دارای مقاومت بوده است (8).

در سال 2007 مهدوی و کرمانشاهی و جلالی اثر نیسین را بر روی تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای تشکیل دهنده بیوفیلم با روش میکروتیترپلیت نشان دادند و مشخص نمودند که این ماده با غلظت در حد مجاز بیشترین تأثیر را بر حذف بیوفیلم باکتری *Salmonella enteritis* دارد (9).

در ادامه این پژوهش میزان هیدروفوبیستی 60 سویه باکتری جداسازی شده با روش MATH تعیین شد و سپس تشکیل بیوفیلم در سویه‌هایی که بالاترین میزان هیدروفوبیستی را داشتند مشخص گردید و اثر پیوسایدها و مواد محافظ بر بیوفیلم باکتری‌های جداسازی شده بررسی گردید. نتایج نشان داد که هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید ئیدروژن از کارایی خوبی از نظر بیوسایدها بکار رفته داشته و نیسین بهترین ماده محافظ در برابر بیوفیلم باکتریها می‌باشد (10).

در مطالعات انجام شده توسط کرمانشاهی و عروجعلیان و همکاران در سال 1388 تأثیر خواص ضد میکروبی سوپرناتانت باکتری *L.plantarumATCC8014* و تأثیر کشت توأم لاکتوکوکوس لاکتیس و با باکتری‌های مولد اسید لاکتیک و باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی مانند *B.cereus* و *L.monocytogenes* بر تولید نیسین با روش‌های میکروبیولوژیکی و بصورت کمی با استفاده از Real-time PCR مورد

بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیان ژن نیسین در هنگام کشت توأم با باکتری‌های LAB و باکتری‌های پاتوژن مزبور افزایش نشان می‌دهد (12 و11).

در تحقیقات انجام شده در سال 2010 و 1388 توسط کرمانشاهی و پیمانفر ابتدا به جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک مانند لاکتوباسیلوس‌ها و آنتروکوکوس‌ها از علوفه سیلو شده ذرت و سبوس برنج انجام گرفت. بعد از بررسی خصوصیات آنها از نظر پروبیوتیکی یعنی تحمل شرایط اسیدی و نمک صفراوی و دمای $50^{\circ}C$ و خاصیت ضد میکروبی، برای بقاء بیشتر آنها و پایدارسازی‌شان از نانو ذرات بیوپلیمری آلژینات و چیتوزان استفاده گردید. علاوه بر این برای تأثیر بیشتر پروبیوتیک‌ها آنها را با پری بیوتیک‌هایی مانند اینولین و افزودنی‌های علوفه مثل آنزیم‌های سلولاز، آلفا- آمیلاز به علوفه ذرت اضافه نموده و آنها ذخیره شدند. نتایج نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده دارای خصوصیات نسبی پروبیوتیکی بوده و پوشش دادن آنها در بهبود بقاء آنها می‌تواند مؤثر باشد و تأثیرات مثبت این باکتری‌ها همراه با اینولین و آنزیم‌ها تجزیه کننده اجزاء گیاهی ثابت شد (14و13) .

جهت از بین بردن باکتری‌های پاتوژن و مقاوم از محیط زیست، مطالعاتی توسط کرمانشاهی و بخشی در سال 1388برای جداسازی و شناسایی این نوع باکتری‌ها از پساب‌های مراکز پرورش طیور انجام شد و سپس گونه‌هایی از لاکتوباسیلوس جداسازی شده و خصوصیات پروبیوتیکی آنها بررسی شد. سپس فعالیت بازدارندگی رشد آنها علیه باکتری‌های پاتوژن و مقاوم جداسازی شده که شامل : آنتروکوکوس فکالیس، اشیرشیاکلی و سودوموناس، کلبسیلا و پروتئوس میرابیلیس بود. با روش overlay بررسی شد. نتایج نشان داد که تعدادی از گونه‌های لاکتوباسیلوس دارای خاصیت پروبیوتیکی بوده و باعث کاهش مقاومت به تتراسیکلین در برخی از سویه‌های اشیرشیاکلی با مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند (16و15).

در مطالعات انجام شده در سال 1387 توسط کرمانشاهی و طهمورث‌پور و همکاران تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم و بیوسورفکتانت تولید شده توسط آن بر اتصال استرپتوکوک‌های دهانی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد و نتایج نشان داد که در حضور این باکتری اتصال استرپتوکوکوس که مهمترین و اولین فاکتور در ایجاد پوسیدگی و بیماری در دندان می‌باشد، کاهش می‌یابد (17).

در سال 1386 و 2010 کرمانشاهی و خالقی و همکاران تولید نانوساختار S-Layer را در شرایط بی‌هوازی و 5 درصد CO_2 در باکتری *L.acidophilus ATCC4356* بررسی نموده و آنرا جداسازی کردند.

تولید پروتئین S-Layer در این باکتری در محیط MRS broth تحت شرایط بی‌هوازی در دمای $37^{\circ}C$ انجام شد و توسط تیمار سلول‌ها با هیدروکلراید گوانیدین استخراج شد و با روش SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و باندهای پروتئین 43 کیلو دالتونی بعنوان پروتئین سطحی شناخته شد (18). همچنین در ادامه این کار تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی تولید و بیان ژن SLP مربوط به این پروتئین در باکتری مزبور انجام شد(19).

در پژوهشی دیگر توسط کرمانشاهی و قاضی‌عسگر در سال 1386 وجود S-Layer در باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم به دست آمد (20). دلیل بررسی تولید نانو ساختار لایه سطحی (Surface Layer) که آرایه‌های کریستالی با زیر واحدهای پروتئینی هستند و دارای وزن ملکولی 200-40 کیلو دالتون بر حسب نوع باکتری می‌باشند، داشتن ویژگی‌های بی نظیر این لایه از جمله نظم ساختاری بسیار بالا، خصوصیات خود ساماندهی در بعضی از سطوح و قدرت محافظتی آن در شرایط سخت می‌باشد و این امر پتانسیل وسیع این لایه را برای کاربردهای مختلف در بیوتکنولوژی و نانوبیوتکنولوژی و زیست‌پزشکی بسیار مناسب نموده است. کاربردهای لایه‌های سطحی در حال حاضر عبارتند از: حامل‌های آنتی‌ژن، دارو و واکسن بوده و به عنوان غشاءهای اولترافیلتراسیون دارای منافذ یکسان، مورد استفاده قرار می‌گیرند (21).

همچنین برای پایداری وزیکول‌های لیپیدی مصنوعی مثل لیپوزوم‌ها در برابر شیره پانکراس و نمک‌های صفراوی، شوک‌های حرارتی و تغییرات pH کاربرد دارند (22).

منابع :

Boyle.S.R, Roy M, Brown and L.K Tang 2006 Use in clinical practice: What are the risks? American Journal of clinical nutrition. June.83(6): 1256-1264

روحا- کسرای کرمانشاهی و سامان ملکی ورکی، 1388. میکروب‌شناسی برای همه، انتشارات دیباگران تهران.

1- Van Niel CW.Feuditenerc. Garry son MM. 2002. Review: Lactobacillus is safe and effective for treating Children April, 109: 678-684.

2- Survarra V.C. and Bobby V. U. 2005. Probiotics in Human Health : A current Assessment current science 88 (11): 1744-1748

3- Mirhosaini.M, I.Nahvi, R.Kasra Kermanshahi and M.Tavassoli 2006. Isolation of Bacteriocin producing *Lactoccoccus lactis* strain from Dairy products. International Journal of Fairy. Sciences 1(1): 51-56.

1- آمنه نصر، روحا کسرای کرمانشاهی و ایرج نحوی بهار 1386. بررسی تأثیر اسیدهای آلی و نایسین در غلظت‌های کمتر از مهارکننده بر رشد سویه باسیلوس سرئوس جدا شده از پنیر . مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. سال دوم شماره 1، ص : 30-21.

2- آمنه نصر، روحا- کسرای کرمانشاهی و ایرج نحوی. 1385. کار این نیسن روی باکتری باسیلوس سرئوس مقاوم به برخی از مواد نگهدارنده پنیر. مجله پژوهشی علوم پایه دانشگاه اصفهان جلد 24 شماره 2 ص .....

3- آمنه نصر، روحا-کسرای کرمانشاهی و ایرج نحوی 1386. ارزیابی کارایی نایسین بر روی لیستریاسیتوژنز جدا شده از شیر و مقاوم نسبت به برخی از اسیدهای آلی در پنیر. مجله زیست‌شناسی ایران، جلد20، شماره 3، ص 196-205.

4- Mahdavi.M, M.Jallali, R.Kasra Kermanshahi, 2007. The effect of nisin on biofilm forming food borne bacteria using microtiter plate method. Research in pharmaceutical sciences.2 (2): 113-118.

5- Mahdavi.M, M.Jallali, R.Kasra Kermanshahi, 2008. The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing Environments. Research Journal of microbiology.
3(3): 181-186

فاطمه، عروجعلیان: پایان‌نامه کارشناسی ارشد تحت راهنمایی روحا- کسرای کرمانشاهی و محمدرضا باسامی، 1388. دانشگاه اصفهان. بررسی اثر برخی اسانس‌های گیاهی و باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک بر برخی باکتری‌های پاتوژن مواد غذایی و بیان ژن نایسین A در *Lactococus lactis* در سیستم کشت توأم .

6- فاطمه، عروجعلیان، روحا-کسرای کرمانشاهی و محمدرضا باسامی 1388.

Antibacterial activity of Cell-free supernatant of two probiotic lactobacilli or food born pathogenic bacteria. یازدهمین همایش بین‌المللی داروسازی ایران –

7- Peymanfar, Sh., R.Kasra Kermanshahi, S.Fuladi. 2010. Isolation and Identification of Lactobacillus Spp. From corn silage for probiotic application and micro encapsolution with alginate and chitosan. Iranian society of Microbiology, Inpress.

8- شراره پیمانفر، روحا-کسرای کرمانشاهی و جمشید فولادی.1388. جداسازی و شناسایی گونه‌ای از آنتروکوکوس از علوفه سیلو شده ذرت برای کاربرد پروبیوتیکی آن. دهمین کنگره سراسری میکروب‌شناسی ایران دانشگاه علوم پزشکی ایلام.

9- الهام بخشی، روحا-کسرای کرمانشاهی و سارا غروی .1388. جداسازی و شناسایی گونه‌ای از لاکتوباسیلوس از پساب مراکز پرورش طیور. دهمین کنگره سراسری میکروب‌شناسی ایران. دانشگاه علوم پزشکی ایلام.

10- الهام بخشی، روحا-کسرای کرمانشاهی و سارا غروی .1388. ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی در تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده از پساب مراکز پرورش طیور. دهمین کنگره سراسری میکروب‌شناسی ایران. دانشگاه علوم پزشکی ایلام.

11- آرزو طهمورث‌پور، روحا-کسرای کرمانشاهی، رسول صالحی، عبدالرضا بنی‌نژاد.1387. تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر اتصال استرپتوکوک‌های دهانی در شرایط آزمایشگاه مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران. سال 2 شماره 1، ص: 51-45.

12- موج خالقی، روحا-کسرای کرمانشاهی، سید حمید زرکش.1386. بررسی تولید نانوساختار S-Layer در شرایط بی‌هوازی و 5 درصد Co_2 در باکتری *L.acidophilus ATCC4356*. مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران. سال 1 شماره 4 صفحات 51-47.

13- Khaleghi, M. R.Kasra Kermanshahi, M.M.Yaghoobi, SH. Zarkesh and A.Baghi Zadeh.2010. Assessment of Bile.Salt Effects on S-Layer production, SLP Gene Expression and, some physicochemical properties of *L.acidophilus ATCC4356*. journal of microbiology Biotechnology. On line

14- روحا-کسرای کرمانشاهی، قاضی عسگر، لیلا و زرکش، سید حمید. 1386.

بررسی تولید نانوساختار S-Layer در باکتری‌های پروبیوتیک *L.lantarum PTCC1058* و *L.casei*. کامل مقاله، پنجمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی .تهران.

15- Felnerova, D J.F.Viret, R. Gluck and Moser.2004. Liposomes and Virosomes as delivery system for antigens, nucleic acid and drugs. Current opinion Biotechnology. 15.518-529.

16- Holl man, A.L.Del federioco, G.Glikmann, G.Dantoni, L.Semrile. And E.A.Disalvo.2007. Characterization of Liposome's coated with S-Layer proteins from

باکتری های اسید لاکتیک و غذاهای فراویژه

حجازی- محمد امین **استادیار پژوهشی و مدیر- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمالغرب و غرب کشور- تبریز

عبارت فراویژه به غذاهایی اطلاق می شود که در کنار داشتن ارزش تغذیه ای حاوی ترکیباتی هستند که موجب کمک به انجام بهتر وظایف و کارکرد های بدن انسان می شود. تولید غذاهای تخمیر شده سابقه چندین هزار ساله دارد. این فرآیند در طیف وسیعی از مواد غذایی اتفاق می افتد و یکی از اثرات آن علاوه از افزایش ارزش تغذیه ای تولید ترکیبات فراویژه در چنین محصولات است. باکتری های اسید لاکتیک نقش کلیدی در تولید اغلب غذاهای تخمیر شده دارند. این مقاله سعی دارد با یک نگاه کلی تر به نقش باکتری های اسید لاکتیک در تولید فرآورده های غذایی تخمیری و نیز در افزایش ارزش تغذیه ای و ارتقائ سلامت مصرف کنندگان (اثر پروبیوتیکی) بپردازد.

در این مقاله دو نوع از محصولات غذایی تخمیری مورد بحث قرار می گیرد: محصولات تخمیر شده که پس از فرآیند تخمیر تحت فرآیند های حرارتی قرار گیرند مانند اکثر فراورده های تخمیری غلات و محصولاتی که بدون فرآیند های بعدی مورد استفاده قرار گیرند همانند اکثر فراورده های تخمیری لبنی. در حالت اول این محصولات حاوی باکتری های زنده نیستند ولی اثرات عملکردی ناشی از فعالیت باکتری های اسید لاکتیک در آنها باقی می ماند. در حالت دوم محصولات تخمیری حاوی باکتری های زنده هستند و علاوه بر اثرات عملکردی ناشی از تولید ترکیبات خاص خود باکتری ها نیز می توانند در صورت تحمل شرایط حاکم بر سیستم گوارشی بعنوان پروبیوتیک عمل نمایند.

همچنین در این مقاله طرح های پژوهشی و دیگر فعالیت های تحقیقاتی در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور شامل جداسازی، شناسایی و غربالگری باکتری های اسید لاکتیک از منابع مختلف غذایی در ارتباط با خصوصیات تکنولوژیکی و عملکردی آن ها در شرایط *invitro* و *invivo* و مشارکت و همکاری با بخش خصوصی در زمینه فرمولاسیون و تولید محصولات غذایی فراویژه بصورت اجمالی مورد بحث قرار می گیرد.

کلمات کلیدی: غذاهای فراوبژه- باکتری های اسید لاکتیک- تخمیر- پروبیوتیک

Lac Acid Bacteria and Functional Foods

Hejazi , Mohammad Amin **

Asistant Professor and Head, Branch for the Northwest and West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Tabriz, Iran.

aminhejazi@abrii.ac.ir

Functional foods are referred to those contain components with beneficial effects on the better function of human body besides having notorious value. Fermented foods are being produced by human from thousands years ago. This process is occurred in a wide range of foods. During the fermentation, nutritional value of the food is increased and components with functional effects are produced. Lactic acid bacteria (LAB) play a key role in production of the most fermented foods. In this paper we discuss the universal role of LAB on fermentation process, their beneficial effects on enhancement of nutritional value of the foods as well as their health benefits on the host (probiotic effect).

We discuss two types of the fermented foods. The foods are thermally treated before consumption e.g. most of fermented cereal products and the foods are directly used without any further treatment e.g. most of fermented dairy products. In the first case the final products do not contain any living microorganisms but the functional effects, occurred by the activity of LAB during the fermentation, remains. In the second case the final products contain living microorganisms. If these microorganisms could resist the severe condition of digestion system, besides beneficial effects received by their activity during the fermentation, they could be considered as probiotic.

Moreover, we briefly introduce the most important research activities in the Branch for the Northwest and West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran on LAB Biotechnology. The activities include: isolation, identification and screening of LAB based on their technological and functional properties at *in vitro* and *in vivo* conditions, and collaboration with food processing companies on formulation and production of functional foods.

Key words: Functional foods, Lactic Acid Bacteria (LAB), Fermentation, Probiotic

پروبیوتیک ها واثرات آنها در حیوانات آزمایشگاهی

میترا حیدری نصرآبادی ،مریم تاج آبادی ابراهیمی، استادیار زیست شناسی تکوینی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند استادیار میکروبشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف انها به تعداد معین سبب ایجاد اثرات مفید در مصرف کننده می‌شود. از خصوصیات عملکردی این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی، کاهش کلسترول سرمی، کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش احتمال ابتلا به سرطان، کاهش الرژی‌های پوستی و غذایی در اطفال، کاهش عفونت‌های راجعه مثانه، گوش و اسهال‌های مزمن و مسافرتی اشاره کرد. بیشتر مطالعات در این زمینه روی لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتری‌ها صورت گرفته است. اگرچه باکتری‌های اسید لاکتیک روده‌ای دیگر مانند انتروکوکوس نیز ممکن است دارای خاصیت پروبیوتیکی باشند.

باکتری‌های پروبیوتیک فلور طبیعی روده هستند که علاوه بر کمک به گوارش مولکولهای پیچیده ، ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی بیوتیک‌های مختلف را تولید می‌کنند که برای بدن مفید می‌باشد. باکتری‌های پربیوتیک دارای اثرات بیشماری هستند. یکی از این اثرات کمک به رفع اسهال حاد در کودکان است. این نوع از اسهال توسط rotavirus ایجاد می‌شود که یکی از عوامل عفونت‌زای عمومی در کشورهای غربی است. یکی دیگر از اثرات پروبیوتیک‌ها توازن عملکرد معدی گوارشی در طول درمان انتی‌بیوتیکی است [1] .. این باکتری‌ها یک تاریخچه طولانی استفاده در مواد غذایی دارند . عملکرد باکتری‌های اسید لاکتیک بستگی به نژاد ، گونه و مقدار کافی باکتری در روده دارد .. آنها می‌توانند هضم لاکتوز را بهبود بخشند ، و در پایداری و مبارزه علیه عفونت ، به سیستم ایمنی در بدن کمک می‌کنند . همچنین باعث ممانعت و کاهش رشد سرطان کلون ، کاهش میزان کلسترول ، ممانعت از عفونت‌های دستگاه ادراری- تناسلی و درمان آلرژی‌های غذایی می‌شوند

توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در ممانعت از رشد باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت به خوبی شناخته شده است. این ممانعت احتمالا به خاطر تولید اسیدهای الی مانند اسید استیک، پروکسید هیدروژن و باکتروسین، سوبستراهای باکتریوسین شکل و بیوسورفاکتانت در این باکتریها می‌باشد[2].. از طرف دیگر،علیرغم گزارشات فراوان مبنی بر اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها ، هنوز بر روی بسیاری از سویه‌های باکتریایی بومی ایران و اثرات درمانی آنهامطالعه کافی صورت نگرفته است .

از اینرو بر آن شدیم اثرات درمانی تعدادی از سوشهای بومی ایران آنها در حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دهیم .پس از جداسازی تعدادی سوش های بومی.[3]..برخی از آنها انتخاب و مطالعات زیر برای آنها انجام شد .

الف – توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش در محیط کشت لاین سلولی caco2

ب- اثر تجویز خوراکی این باکتریها بر کلسترول ولیپوپروتئین های خون در موش های رت نر بالغ طبیعی

ج – اثر تجویز خوراکی باکتریهای پروبیوتیک بومی ایران بر پروفایل لیپید و آنزیم های کبدی در موش های هیپرکلسترومی

د – اثر بر ترمیم زخم های پوستی در موش رت نر بالغ

ه – اثر بر ترمیم زخم های گوارشی در موش رت نر بالغ

الف – توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش در محیط کشت لاین سلولی caco2

مکانیسم‌های پیشنهادی زیادی برای توجیه توانایی پروبیوتیک‌ها در محافظت میزبان در برابر اختلالات گوارشی وجود دارد.یکی از این فرایند ها کولونیزاسیون است مهار رقابتی جایگاه‌های اتصال باکتریایی بر روی سطوح اپی تلیال روده، یک مکانیسم دیگر اثر بخشی پروبیوتیک‌ها است . امروزه این مسئله پذیرفته شده است که بسیاری از پاتوژن‌های روده‌ای برای استقرار درروده و ایجاد بیماری باید بتوانند به دیواره روده متصل شوند. با توجه به این مسئله، تعدادی از گونه‌های پروبیوتیک‌ها به دلیل توانایی اتصالشان به سلول‌های اپی‌تلیال انتخاب شده‌اند..[4]..رقابت برای جذب مواد غذایی نیز به عنوان یکی از مکانیسم‌های اثر پروبیوتیک‌ها پیشنهاد شده است. پربیوتیک‌ها احتمالاً از مواد غذایی که مورد مصرف باکتری‌های بیماری‌زا قرارمی‌گیرد استفاده می‌کنند. مطالعه بقاء باکتری ها در سیستم گوارشی یکی از مهمترین فاکتورها در انتخاب سویه پروبیوتیک است

اتصال یا چسبندگی باکتری به سطح سلول یکی از عوامل موثر در بیماری‌زایی باکتریهای مهاجم است. گاهی چسبندگی به‌طور غیر اختصاصی توسط اتصالات یونی و هیدروفوبیک ویا اختصاصی بواسطه لیگاندها و رسپتور صورت می‌گیرد.گاهی چسبندگی به شدت اختصاصی است بطوریکه باکتری تنها به سوبسترایی وصل می شود که نوع بخصوصی از رسپتور را داشته باشد.

در این تحقیق از 22 سویه‌لاکتوباسیل جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران که در بررسی‌های قبلی خصوصیات پروبیوتیکی آن‌ها مثل مقاومت به اسید و صفرا، تولید ترکیبات ضد میکروبی و جذب کلسترول به اثبات رسیده بود استفاده شد. [7-5]... همچنین یک سوش پروبیوتیک تجاری (LA-5) بعنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. قبل از انجام هر آزمون این باکتری‌ها در محیط MRS broth در شرایط بی‌هوازی و دمای 37 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت کشت داده شدند.

سلول Caco-2 از موسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت Dulbeco`s modified eagle`s, minimal essential mediumکشت سلول به هر چاهک اسلاید چمبر تلقیح شدند. بعد از 24 ساعت به هر چاهک 300 µl بافر فسفات و لاکتوباسیل به غلظت 10^8–10^9 CFU/mlاضافه شد. شمارش سلول‌های متصل به کشت سلول Caco-2 به دو روش رنگ آمیزی وکشت در محیط اختصاصی صورت گرفت

در روش رنگ‌آمیزی سویه‌های مورد بررسی بر اساس متوسط تعداد لاکتوباسیل‌های متصل در سه گروه ضعیف متوسط و قوی قرار گرفتند. در این بررسی‌بعنوان شاهد مثبت از سویه تجاری LA-5 استفاده شد. سویه‌های Aa1 و Y2l6 مشابه سویه تجاری LA-5 با متوسط تعداد لاکتوباسیل بالای 1000بیشترین توانایی اتصال را نشان دادند.

نتایج اتصال سویه‌های لاکتوباسیل به سلول های کشت Caco-2 با روش کشت متفاوت از نتایج بدست آمده ار روش رنگ‌آمیزی بود. سویه‌های مانند Y1l4, Y2n2, Y2f3, Y2c4, C5i4 که در روش رنگ‌آمیزی اتصال بسیار ضعیفی را نشان می‌دادند در روش کشت بر اساس کلنی های رشد کرده روی محیط انتخابی اتصال قوی را نشان دادند. بررسی میکروسکوپی این سویه‌ها نشان داد اندازه کوچک این باکتری‌ها در مقابل سلول‌های Caco-2 موجب خطای دید و عدم شمارش این باکتری‌ها در روش رنگ آمیزی بوده است. لذا به نظر می‌رسد روش رنگ‌آمیزی روش موثقی جهت بررسی توانایی اتصال باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت سلولی نمی‌باشد.

نتایج این تحقیقات نشان دادند توانایی اتصال حتی در یک گونه از جنس لاکتوباسیلوس متغییر و وابسته به سویه است. این نتایج اهمیت بررسی توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش در شرایط *invitro* به منظور انتخاب سویه های پروبیوتیک را تائید می‌کند.

ب – اثر تجویز خوراکی این باکتریها بر کلسترول ولیپوپروتئین های خون در موش های رت نر بالغ طبیعی و

ج – اثر تجویز خوراکی باکتریهای پروبیوتیک بومی ایران بر پروفایل لیپید و آنزیم های کبدی در موش های هیپرکلسترومی

عوارض زندگی مدرن مانند کم تحرکی ،استرس ،پرخوری وغذاهای غنی از لیپیدها وکربوهیدرات ها موجب شده که امروزه بیماری های قلبی عروقی یکی از عوامل عمده مرگ ومیر درسرتاسر دنیا باشند . نارسایی های مزمن قلبی عامل مرگ 24 درصد زنان و31 درصد مردان در امریکا بوده وپیش بینی می شود که تا سال 2020 عمده ترین عامل مرگ و میر در دنیا باشد [8] تحقیقات نشان داده است که ارتباط مستقیم ومعنی داری بین کلسترول تام خون و LDL سرم ونیز رابطه معکوس بین LDL و وقوع بیماری های مزمن قلبی وجود دارد

. با افزایش هر میکرومول کلسترول (بالای حد طبیعی) احتمال بیماری های قلبی 35٪ و احتمال مرگ ناشی از حملات قلبی 45٪ افزایش می‌یابد. کاهش جزئی کلسترول سرمی به میزان 1٪ می‌تواند منجر به کاهش 2–3٪ حملات قلبی شود. مطالعات متعددی نشان می‌دهد برخی از لاکتوباسیل‌ها می‌توانند سطح توتال کلسترول و LDL را کاهش دهند. از این رو استفاده محصولات لبنی حاوی پروبیوتیک می تواند منجر به کاهش سطح کلسترول سرمی شود [8].

این عوارض دانشمندان را بر آن میدارد که به دنبال باکتریهای پروبیوتیکی باشند که بتوانند موجب کاهش غلظت کلسترول خون شوند به همین جهت مطالعات زیر صورت پذیرفت .

تعداد28 سر موش رت نژاد ویستار تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در آزمایشگاه و در دمای 2±22 درجه سانتی گراد نگهداری شدند و به 4گروه تجربی شامل گروه تجربی 1 ، گروه تجربی 2 ، و گروه تجربی 3 وگروه کنترل تقسیم شدند. در شرایط نوری محیط و به آب و غذا به هر مقدار که مایل بودند دسترسی داشتند

هر گروه شامل 7 موش رت نربود.. در روز اول همه موش ها وزن کشی شده و هر گروه شامل موش هایی با وزن تقریبا مساوی وحداکثربا 20 گرم تفاوت بود به کلیه گروهها با سرنگ مخصوص گاواژ رت به ترتیب مقدار 2میلی لیتر skim milkبه تنهایی(در گروه کنترل) ،یا بعلاوه لاکتوباسیل های مورد نظر داده شد.(گروههای تجربی 1و2و3 :)این تیمار به مدت 3 هفته هر روز تکرار گردید و پس از آن ابتدا موش ها وزن کشی شده وسپس با اتر بیهوش شده و با بازکردن قفسه ی سینه کشته شدند و خونگیری مستقیم از قلب انجام گرفت.

همچنین در روز 1 آزمایش و روز21 تجربیات مقدار یک گرم مدفوع تازه از هر موش جمع آوری شد و جهت آزمایشهای شمارش باکتریهای مدفوع مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه های خون گرفته شده از قلب در لوله های استریل جمع آوری شده وسانتریفوژشده (2000 دور برای 15 دقیقه در 4 درجه سانتی گراد)و سرم جدا شده ودرفریزر 20- نگهداری شدندوپس از نمونه گیری از همه گروهها ، نمونه های سرم جهت یررسی میزان کلسترول توتال LDL و HDL و تری گلیسیرید به آزمایشگاه فرستاده شد.کلیه این آزمایش ها هم در موش های طبیعی و هم در موش های هیپرکلسترومی انجام شد نتایج حاصل در بررسی های آماری نشان داد که این باکتریها توانستند میزان کلسترول و تری گلیسرید های خون را تغییر وکاهش دهند .

د – پروبیوتیک‌هاو اثرات انها برترمیم زخم های پوستی

. تاخیر در ترمیم زخم بویژه در سالمندی وبیماران دیابتی ،اهمیت ترمیم در زخم های ناشی ازسوختگی و بازشدگی زخم‌های جراحی وعفونت زخم ها از مشکلات بالینی همیشگی هستند که بر زندگی، رفتارها، اقتصاد، سیستم‌های مراقبت سلامتی اثر می‌گذارد و لذا یافتن مواردی که در بهبود زخم موثرند موضوع پژوهش های بسیاری است .پروبیوتیک ها ممکن است در این مقوله قرار گیرند . [9].

بطور کلی ترمیم زخم را به سه فاز التهاب، تکثیر و تجدید ساختار تقسیم میکنند. در فاز التهاب طی 24 ساعت اول پس از آسیب نوتروفیل‌ها به حداکثر رسیده و پس از 3 روز کاهش می‌یابند. در عرض 24 تا 48 ساعت ماکروفاژها به حداکثر می‌رسند و در روز پنجم اکثریت سلول-

های زخم را تشکیل می‌دهند. فاز تکثیر سلولی از انتهای فاز التهاب شروع می‌شود که روز سوم پس از آسیب است. فیبروبلاست، کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان می‌سازد. میزان سنتز کلاژن تا سه هفته به طور مداوم زیاد می‌شود تا یک نقطه تعادل به دست آید فاز تجدید ساختار سه هفته بعد از آسیب شروع می‌شود که در آن تعادل بین سنتز و تجزیه کلاژن وجود دارد، این مرحله تا دو سال طول می‌کشد و در طی آن کلاژن نوع 3 به نوع 1 تبدیل می‌شود [10].

نشان داده شده که پروبیوتیک ها می توانند ترمیم زخم را تسریع بخشند . تحریک سیستم ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی ممکن است از جمله مکانیسم‌های اثر پروبیوتیک‌ها باشد. پروبیوتیک‌ها در سطوح متعددی برروی سیستم ایمنی تاثیر می‌گذارند که از جمله می‌توان افزایش سطح سایتوکاین‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلئاز، فعال کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت سلول‌های Natural killer، تعدیل خود ایمنی و تحریک ایمنی در برابر باکتری‌های بیماریزا و پروتوزوآها را نام برد. نشان داده شده است که تمامی سلول‌های باکتریایی، تکثیر سلول‌های ایمنی را افزایش می‌دهند و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی مانند فاکتور نکروز تومور α و اینترلوکین 6 را القاء می‌کنند. برعکس، پروبیوتیک‌ها سرکوب تکثیر لنفوسیت‌ها و تولید سایتوکاین‌ها توسط سلول‌های T را تحت تاثیر قرار می‌دهند. مهم‌تر از همه اینکه پروبیوتیک‌ها این اثرات مثبت را بر روی سیستم ایمنی بدون ایجاد یک پاسخ التهابی مضر اعمال می‌کنند. پاسخ ایمنی، ممکن است زمانی که چند پروبیوتیک با هم مصرف شوند و بصورت سینرژیک عمل کنند، افزایش یابد. همچنان که عموماً این اثر زمانی که تلفیقی از لاکتو باسیلوس‌ها و بیفیدو باکتریا مصرف شود دیده می‌شود. [11].

تحریک مقاومت غیر اختصاصی میزبان در برابر باکتری‌های بیماریزا بوسیله پروبیوتیک‌ها باعث متعادل کـــردن پاسخ‌های ایمنی میزبان برعلیه این باکتری‌های بیماریزا از طریق کاهش واکنش‌های افزایش حساسیت می‌شود

. همچنین این نکته نیز حائز اهمیت است که پروبیوتیک‌ها احتمالا مسئول چهار اثر جانبی مضرنیزمی‌باشند: عفونت‌زایی سیستمیک، فعالیت‌های متابولیکی اسیب رسان، تحریک بیش از اندازه ایمنی در افراد مستعد و انتقال ژن، تعداد اندکی از اینگونه رخدادهای مغایردر پروبیوتیک‌های مصرفی انسان گزارش شده است [12].

ه – پروبیوتیک ها وترمیم زخم های گوارشی

. این باکتری‌ها تاریخچه طولانی استفاده در مواد غذایی دارند . یکی از بارزترین خصوصیات این باکتری‌ها ، ترمیم و کاهش زخم‌های گوارشی است [13] . زخم‌های گوارشی و معده ، یک سوراخ کوچک یا یک خوردگی در مجرای معدی– روده‌ای است

تصور می شود پروبیوتیک‌ها می‌توانند در ترمیم زخم‌های معده در طی یک مکانیزم عمل مشخص که افزایش تکثیر سلولی و آنژیوژنز و کاهش مرگ سلولی در غشای مخاطی معده است نقش مستقیم داشته باشند . همچنین می‌توانند بیان فاکتورهای رشد را افزایش دهند و ترمیم زخم را تسریع کنند . آنها ترمیم زخم رابا فعالسازی گیرنده EGF (epidermal growth factor receptor) ، افزایش تنظیم ODC

(ornithine decarboxylase) ، Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) و شاید بیان پروتئین VEGF (vascular endothelial growth factor) در بافت‌های زخم شده ، تسهیل می‌کنند . این تغییرات باعث القای آنژیوژنز و کاهش نسبت مرگ سلولی به تکثیر سلولی می‌شود . همه‌ی این تغییرات باعث پیشبرد ترمیم زخم می‌شوند . [14]

تلقیح با باکتری LGG بر عملکرد فیزیولوژیک غشاء مخاطی یک معده‌ی طبیعی اثری ندارد اما معده‌هایی با تغییرات غیرعادی در طی زخم‌های گوارشی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [21] LGG توانایی ایجاد کلونی در مجرای معدی- روده‌ای انسان را دارد [15] . در رت‌ها پروبیوتیک‌ها می‌توانند اثرات حفاظتی بر ضد آسیب روده‌ای القا شده به واسطه اشعه داشته باشند[19]. برخی از نژادهای لاکتوباسیل قادر به مهار رشد H.pylori بوسیله رهاسازی اسیدهای آلی هستند و همچنین ممکن است چسبندگی آنها به سلولهای اپیتلیالی را کاهش دهند . به علاوه پروبیوتیک‌ها در تثبیت عملکرد سد غشاء مخاطی معدی و کاهش التهاب غشاء مخاطی نقش دارند . پروبیوتیک‌ها بطور عمومی H.pylori را ریشه‌کن نمی‌کنند اما تراکم کلونی‌سازی را کاهش می‌دهند [16] . پروبیوتیک‌ها در درمان کلونی‌سازی قارچی در مجرای معدی – روده‌ای موثر هستند [17,18] . چندین باکتری اسیدلاکتیک کمک به ممانعت از آغاز سرطان کلون می‌کنند . همچنین آنها رشد سرطان‌های تجربی را کند می‌کنند. [20]

آنچه که از مرور این مطالعات برمی‌آید ، اهمیت درمانی این باکتری‌ها مخصوصا در دستگاه گوارش است لذا ، دارای ارزش وپتانسیل درمانی است .

به این منظور برای بررسی اثرات باکتریهای پروبیوتیک بدست آمده از مطالعات قبلی برترمیم زخم معده از رت‌های نربالغ استفاده گردید رت ها با رژیم آزمایشگاهی استاندارد تغذیه شدند .قبل از القا زخم رت‌ها برای 24 ساعت از غذا محروم شده اما به آنها آب داده شد . زخم گوارشی توسط القای لومینال محلول اسید استیک ایجادشده (60 % v/v) . سپس رت‌ها با یک رژیم غذایی استاندارد آزمایشگاهی و آب معمولی تغذیه شدند.

درمان باکتریایی و اندازه‌گیری ناحیه‌ی زخم گوارشی :

یک روز پس از القای زخم ، رت‌ها به صورت داخل شکمی با آب مقطر استریل شده یا با لاکتوباسیل در غلظت 1×10^8 cfu/ml یا 1 x 10^9 cfu/ml با سوزن گاواژ (طول : 5 cm ، قطر 3 mm) برای چند روز متوالی تغذیه شدند (یعنی 2×10^8 cfu/day یا 2×10^9 cfu/day برای لاکتوباسیل) . رت‌ها در روزهای سوم ، پنجم وهفتم پس از القای زخم کشته شده و اندازه‌های زخم (mm2) در دیواره‌های قدامی و خلفی و در هر معده تعیین شد . نمونه‌ها برای تثبیت در داخل فرمالین 10 درصد قرار گرفته و پس از پاساژ و تهیه برش بافتی با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند. سپس با استفاده از عدسی چشمی مدرج مقاطع بافتی از نظر تعداد فیبروبلاست ، نوتروفیل ، ، ماکروفاژ و سایرگلبول سفید در واحد سطح بررسی شدند .نتایج حاصل از بررسی آماری داده های فوق نشان داد که ترمیم زخم معده در گروههایی که با پروبیوتیک های ما تلقیح شده بودند سریعتر از گروههای کنترل صورت گرفت .

کاربرد باکتریهای اسید لاکتیک در استخراج مواد

آنیتا خنافری، دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده:

باکتریهای اسید لاکتیک (LAB)، باکتریهایی به اشکال میله ای یا کروی شکل بوده که با افزایش تحمل پذیری به pH13 اسیدی شناخته می شوند. لاکتوباسیلها بزرگترین گروه از باکتریهای اسید لاکتیک با توانایی تبدیل لاکتوز و سایر قندها به اسید لاکتیک می باشند. بسیاری از گونه ها قادر به تجزیه ترکیبات گیاهی بوده و توانایی تولید اسید لاکتیک توسط آنها ضمن اسیدی کردن محیط، مانع رشد بعضی از باکتریهای مضر می گردد. از برخی از گونه های لاکتوباسیلوس در صنعت جهت تولید مواد لبنی نظیر ماست و پنیر و ترکیباتی شامل باکتریوسین، اگزوپلی ساکارید، پلی ال و ویتامینهای گروه B استفاده می شود. بعضی از گونه های لاکتوباسیلوس و دیگر باکتریهای اسید لاکتیک پتاسیل درمانی شامل خاصیت ضدالتهابی و ضدسرطانی دارند. علارغم فوائد، برخی از گونه های لاکتوباسیلوسها با پوسیدگی دندان ارتباط داشته و شمارش تعداد لاکتوباسلیوسهای موجود در بزاق بعنوان آزمون حامل از گذشته انجام می شده است. با توجه به اهمیت استفاده از باکتریهای اسید لاکتیک در صنعت، هدف از انجام این تحقیق بررسی مروری بر روی عملکرد این باکتریها در کاهش جمعیت میکروبی، مبارزه بیولوژیک و تسهیل روند استخراج ترکیبات می باشد.

کلمات کلیدی: باکتریهای اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس، استخراج

Lactic Acid Bacteria Application in Compounds Extraction

Anita Khanafari

Associated Prof. Microbiology Department, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

The Lactic Acid Bacteria (LAB) is rod-shaped bacilli or coccus which is characterized by an increased tolerance to acid pH range. *Lactobacillus* is major part of the lactic acid bacteria group with convert lactose and other sugars to lactic acid. Many species are prominent in decaying plant material and production of lactic acid makes its environment acidic, which inhibits the growth of some harmful bacteria. Some *Lactobacillus* species are used industrially for the production of dairy product such as yogurt, cheese and the other product as bacteriocins, exopolysaccharides, polyols and B vitamins. Some *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria may possess potential therapeutic properties including anti-inflammatory and anti-cancer activities. Although considered beneficial, some *Lactobacillus* species have been associated with dental caries. *Lactobacillus* count in saliva has been used as a "caries test" for many years. Due to lactic acid bacteria industry

application significance, this review summarizes to study of usage these bacteria with antimicrobial effects, biological combating and simplification of compounds extraction.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus*, extraction

مقدمه:

باکتری‌های اسیدلاکتیک (Lactic acid Bacteria, LAB) در بسیاری از محیط‌های غذایی غنی وجود دارند و به طور طبیعی در محصولات لبنی و گوشتی و نیز سبزیجات یافت می‌شوند (1). این میکروارگانیسمها و یا محصولات ضدمیکروبی حاصل از آنها به طور سنتی به عنوان نگهدارنده طبیعی غذا با عملکرد افزایش عمر قفسه ای و ایمنی مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرند. استفاده از فرآیندهای تخمیری در طی دهه‌های اخیر افزایش یافته است و امروزه انواع غذاهای انسانی و یا دامی را شامل می‌شود (2).

قدمت استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک بعنوان عوامل موثر در تخمیر مواد غذایی بسیار قبل از اثبات وجود باکتری ، بوده است. این باکتریها به طور سنتی به عنوان یک روش نگهداری طبیعی، کاربردی و مناسب محیط زیست، در مواد غذایی و غذای دامی، مورد استفاده قرار گرفته اند. مکانیسم اثر نگهدارندگی این باکتریها به کاهش pH ماده غذایی با تولید اسیدلاکتیک نسبت داده می شود. در طی رشد این باکتریها، در کنار تولید اسیدلاکتیک، ترکیبات مختلف ضدمیکروبی دیگری نیز تولید می‌شوند(3).

افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مقاومت به ترکیبات شیمیایی عوامل بیماریزا و نیز فاسد کننده با توجه به افزایش آگاهی عمومی در بین مصرف‌کنندگان، معیارهای متفاوتی را جهت نگهداری مواد غذایی می‌طلبد(4). به نظر می‌رسد که نیاز مبرم جهت دستیابی به راههای جدید گسترش عمر قفسه‌ای مواد غذایی، سرکوب رشد قارچها و ایجاد غذایی ایمنی بدون مواد نگهدارنده وجود دارد. چنین نیازی سبب ترغیب جستجو برای باکتری‌های اسید لاکتیکی با چنین توانایی هایی می‌شود. سابقه طولانی استفاده از این باکتری‌ها در مراحل تخمیری مواد غذایی، در تلفیق‌با یافته‌های اخیر درباره اثرات مثبتی که توسط هضم پروبیوتیک LAB بر روی سلامتی افراد ایجاد می‌شود، سبب شده که این باکتری‌ها به عنوان یک انتخاب مناسب شناخته شوند(5-6).

هدف از این تحقیق بررسی مروری کاربرد باکتریهای فوق به منظور مقابله بیولوژیکی با برخی آفات نظیر آفلاتوکسین حاصل از قارچ آسپرژیلوس فلاوس و کاهش pH محیط توسط این باکتریها در روند تسهیل استخراج برخی ترکیبات نظیر رنگدانه آستاگزانتین بوده است.

طبقه بندی باکتریهای اسید لاکتیک(تاکسونومی):

عبارت باکتری های اسید لاکتیک (LAB) به تدریج در آغاز قرن بیستم پذیرفته شد. عبارات دیگری مثل "باکتری های ترش کننده شیر" و "باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک" که در گذشته برای باکتری های مشابه به کار می رفت، سبب سردرگمی می‌شد. این امر با چاپ یک مونوگراف درباره باکتری های اسید لاکتیک که توسط Orla- Jensen در سال 1919 نوشته شده بود، خاتمه گرفت. این کار اثر قابل توجهی بر سیستماتیک LAB داشت. طبقه بندی جنس های LAB بر پایه مورفولوژی، نوع تخمیر گلوکز، رشد در دماهای خاص و محدوده

مصرف قندها صورت گرفت. با وجود تغییراتی که تا به امروز در مورد تاکسونومی صورت گرفته است، فاکتورهای به کار رفته توسط Orla- Jensen هنوز در طبقه بندی LAB اعمال می‌شود (7).

باکتری های اسید لاکتیک گروهی از باکتری ها با شباهتهای فیزیولوژیکی، متابولیکی و مورفولوژیکی هستند و از نظر فیلوژنتیکی نیز بسیار به هم نزدیک می باشند. در توصیف کلی، این باکتری ها باسیل یا کوکسی های گرم مثبت، بدون اسپور و بی هوازی می باشند که در طی تخمیر کربوهیدرات ها، لاکتیک اسید را به عنوان فراورده نهایی خود تولید می‌کنند. این گروه اصلی شامل چهار جنس ,*Streptococcus* *Pediococcus*, *Leuconostoc* , *Lactobacillus* می باشد. اصلاحات تاکسونومیک اخیر چندین جنس جدید را مطرح کرده است و گروه باقی مانده امروزه شامل جنسهای زیر می باشد:

Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium , Dolosigranulum , Enterococcus , Globicatella, .Lactococcus, Oenococcus, Vagococcus Tetragenococcus, Weissella, Carnobacteria , Lactobacillus بعضی از گونه های Weissella ها میله ای هستند، در حالیکه باقی مانده جنسها کوکسی می باشند (7).

برای شناسایی باکتری های اسید لاکتیک، امروزه به طور متداول از روش های فنوتیپیکی استفاده می شوند. اخیراً، تکنیکهای ژنتیکی، نظیر تعیین ترادف 16S rDNA گسترش یافته است که شناسایی دقیق و مطمئن هر سوش را سبب می‌شود. تعیین ترادف های کوتاه 16S rDNA امروزه به عنوان یک روش ساده برای تعیین گونه‌های باکتری های اسید لاکتیک، استفاده می‌شود(7).

متابولیسم باکتریهای اسید لاکتیک:

باکتریهای اسید لاکتیک برای تخمیر هگزوزها از راههای جور تخمیر (Homofermentative) و ناجور تخمیر (Hetrofermentative) استفاده می کنند. راه جور تخمیر به دنبال گلیکولیز (راه امبدن میرهوف) صورت می گیرد. در گونه های لاکتوباسیلوس جور تخمیر لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس و پدیوکوکوس وجود دارد و از مشخصات آن، شکستن فروکتوز ا و 6 دی فسفات (FDP) به دو بخش گلیسرول آلدئید–3– فسفات (GAP) و دی هیدروکسی استن فسفات (DHAP) (به طور مساوی)، توسط یک FDP آلدولاز می باشد. GAP در مرحله بعد به پیرووات تبدیل می شود و در نهایت به اسید لاکتیک احیاء می گردد (8–7). روش ناجور تخمیر یا روش 6 فسفوگلوکونات/ فسفوکتولاز به طور مشخص با اکسیداسیون گلوکز 6–فسفات به گلوکونات –6–فسفات ازطریق دکربوکسیلاسیون صورت می گیرد. پنتوز باقی مانده به وسیله یک فسفوکتولاز به یک جز C-2 (استیل فسفات) شکسته می‌شود. درنتیجه، مقادیر اکی مولار، CO_2 و لاکتات و اتانول از هگزوز تشکیل می شوند. باکتری های اسید لاکتیک ناجور تخمیر، عموماً پنتوز را تخمیر می کنند. با وجود این بعضی سویه های پنتوز منفی نیز وجود دارد (8). LAB های ناجور تخمیر دارای توانایی استفاده از پذیرنده های الکترون خارجی جهت تولید مجدد NADH و در نتیجه گرفتن انرژی بیشتر هستند. به دلیل این راه جایگزین، استات به جای اتانول تشکیل می شود. یک گروه از باکتری های اسید لاکتیک قادرند هر دو روش را به کار گیرند اما در حضور هگزوزها روش جور تخمیر را ترجیح می‌دهند (7).

جور تخمیر:

$$1\ Hexose + 2\ ADP + 2\ Pi \rightarrow 2\ Lactate + 2ATP$$

ناجورتخمیر:

$$1\ Hexose + 1\ ADP + Pi \rightarrow Lactate + Ethanol + CO_2 + 2\ ATP$$

درحضور گیرنده الکترون خارجی:

$$1\ Hexsoe + 2\ ATP + Pi \rightarrow Lactate + Acetate + CO_2 + 2\ ATP$$

زیستگاه باکتریهای اسید لاکتیک:

باکتری های اسید لاکتیک در طبیعت به طور متداول وجود دارند و عملکرد آنها در فرآیند های تخمیری شناخته شده است. آنها همچنین به عنوان ساکنین سطوح مخاطی موجودات عالی شناخته شده اند. این باکتریها نیازمند محیط های غنی غذایی جهت ساکن شدن می باشند. در کنار هیدراتهای کربن، به اسیدهای آمینه، پپتیدها، نمک ها و ویتامین ها، نیز نیاز دارند (1) .

متابولیت های ضد میکروبی باکتریهای اسید لاکتیک:

اسیدهای آلی:

اسید لاکتیک متابولیت اصلی LAB است که سبب کاهش pH می شود و برای بسیاری از ارگانیسم ها بازدارنده است. هیدروفوبیک ترین شکل اسید که غیرقابل تجزیه است به دیواره سلول نفوذ می‌کند و در داخل سلول تجزیه شده، H^+ ایجاد می‌کند که سبب اسیدی شدن پلاسما می شود (7). علاوه بر اثر pH، اسید تجزیه نشده، شیب الکتروشیمیای پروتون را به هم می زند و با سبب مهار رشد باکتری و در نهایت مرگ باکتری های حساس می شود (9).

LAB های ناجور تخمیر، درحضور گیرنده های خارجی الکترون استیک اسید را در مقادیر نسبتاً زیاد، تولید می‌کنند و در این حالت اسید پروپیونیک تنها در مقادیر ناچیزی تولید می شود. هر دو اسید دارای pk_a بالایی نسبت به اسید لاکتیک هستند بنابراین در یک pH مشخص، اسید غیرقابل تجزیه را در نسبت بالاتر دارا می باشند. مشابه اسید لاکتیک، اسید های استیک و پروپیونیک با دیواره های سلول واکنش داده و شیب الکتروشیمیایی پروتون را خنثی می کند اما اثر اسید استیک و پروپیونیک اغلب به pH کاهش یافته توسط اسید لاکتیک وابسته است (9). اسید پروپیونیک رشد قارچ را به خصوص در pH پایین کاهش می‌دهد و بر دیواره قارچ در pH های کمتر از 4/5 اثر می گذارد. همچنین اسید استیک و اسید پروپیونیک مانع جذب اسید های آمینه می شوند(9). نمکهای اسید پروپیونیک مثل پروپیونات سدیم و پروپیونات آمونیوم اثر مشابهی بر روی مخمرها و قارچهای رشته ای در pH پایین می گذارند. Moon و همکاران در سال 1989 میلادی نشان دادند که ترکیبی از اسیدهای لاکتیک واستیک و پروپیونیک مانع رشد گونه های مخمری می شود. مخمر به طور طبیعی در

غلظتهای بیش از (100mM) هر یک از اسیدها به تنهایی، به جز پروپیونیک اسید، به خوبی رشد می‌کند. اسید لاکتیک تولید شده توسط LAB و استات سدیم موجود در محیط کشت MRS (de man Rgosa, &sharpe)، می توانند اثرات ضد قارچی توأمی ایجاد کنند (11-10). استات سدیم موجود در MRS همچنین می تواند به عنوان یک عامل کمک کننده با سایر ترکیبات ضدقارچی تولید شده توسط LAB عمل کند(12). همچنین مشاهده شده است که LAB های غیربازدارنده می توانند از سوشهای دارای فعالیت ضدقارچی بالا، اسید لاکتیک بیشتری تولید کنند (13).

سایر محصولات نهایی تولید شده:

اکثر LAB ها دارای فلاوو پروتئین اکسیداز ها هستند که به آنها توانایی تولید پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در حضور اکسیژن را می‌دهد. به دلیل اینکه LAB کاتالاز تولید نمی کند، پراکسید هیدروژن در محیط تجمع می یابد (14). اثر ضدمیکروبی پراکسید هیدروژن مربوط به اثر اکسید کنندگی قوی است که بر روی دیواره باکتریایی واثر تخریبی ای که بر روی ساختار مولکولی پایه پروتئین های سلولی دارد، بخوبی شناخته شده است. این اثر ضدمیکروبی در غلظتهای غیربازدارنده به وسیله لاکتوپراکسیداز و تیوسیانات حاضر در شیر و بزاق حمایت می شود. سیستم پراکسید – تیوسیانات – لاکتوپراکسیداز شامل واکنش پراکسید هیدورژن و تیوسانات در حین عمل کاتالیزوری لاکتو پراکسیداز می باشد. هیپوتیوسیانات و سایر محصولات واسطه ای دیگر، رشد سایر میکروارگانیسم ها را باز می دارد. لاکتوپراکسیداز و تیوسیانات در شیر وجود دارد و وقتیکه برخی از LAB ها در شیر و محصولات لبنی رشد می کنند، سومین ترکیب مورد نیاز، پراکسید هیدروژن، اضافه می شود.

دی استیل (2و3-بوتان دیول)، که همان ترکیب به وجود آورنده بوی خاص کره است، دارای اثر ضدمیکروبی در pH پایین است (15) و توسط بعضی گونه های LAB در طول تخمیر سیترات تولید می شود. با این حال، مقادیر مورد نیاز دی استیل جهت نمایان کردن فعالیت ضدمیکروبی (نزدیک به 200mM) به طور مشخصی مزه و بوی محصول را دست خوش تغییر میکند (16).

کاربرد باکتریهای اسید لاکتیک

استفاده از باکتریهای اسید لاکتیک به عنوان نگهدارنده های بیولوژیکی (Biopreservatives):

باکتریهای اسید لاکتیک به طور معمول در مواد غذایی وجود دارند و به عنوان کشتهای خالص به طیف وسیعی از محصولات غذایی اضافه می شوند. آنها را به عنوان میکروگانیسم هایی بی خطر می دانند و حتی در برخی موارد تاثیر آنها در سلامتی انسان و حیوان به اثبات رسیده است(Probiotics). LAB توانایی تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی نظیر محصولات تخمیری کاهش دهنده pH، اسید استیک و اسید لاکتیک و نیز پراکسید هیدروژن، اسید فرمیک، اسید پروپیونیک و دی استیل را دارند (17).

مکانیسم دقیق عمل ضدمیکروبی با توجه به پیچیدگی و همکاری که ترکیبات مختلف با یکدیگر دارند، مشخص نشده است. عمده تحقیقات برمبنای شناسایی و تشخیص مواد مختلف ضدمیکروبی و به خصوص ضد باکتریایی، درسیستم های ساده آزمایشگاهی (In vitro) بوده است و اطلاعات کمی درباره مکانیسم های کلی سیستم های نگهدارنده پیچیده درمحیط های غذایی و غذای دامی وجود دارد. مطالعات درباره اثر LAB برروی قارچها به دلیل حساسیت اکثر قارچها به محصولات عادی تخمیر نظیر اسیدهای لاکتیک واستیک ، پیچیده و دشوار است. گزارشهای انتشار یافته درباره LAB های ضد قارچ محدود است و اکثر آنها به فعالیت بازدارندگی LAB اشاره دارند.

تحقیقاتی مبنی بر اثر محافظتی باکتری‌های اسیدلاکتیک ([LAB] *Lactic acid bacteria*) درمقابل آفلاتوکسین گزارش شده است (19-18). بسیاری از این مطالعات بر روی سویه‌های لاکتوباسیلوس بوده است که در آنهاااتصال فیزیکی به عنوان مکانیسم برداشت آفلاتوکسین، مطرح شده است.

Pelton و همکاران در سال 2001 میلادی با تحقیقی که بر روی 20 سویه باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدیوباکتریوم‌ها انجام دادند، دریافتند که سویه‌های *Lactacillus amylovorus*, *Lactobacillus rhamnosus* بیش از 50% از آفلاتوکسین B_1 (AFB_1) را از محیط مایع در مدت زمان72 ساعت گرماگذاری، برداشت می‌کنند (20).

در تحقیق دیگری پایداری کمپلکس‌های AFB_1 شکل یافته با 12 سویه LAB در حالت زنده و غیرزنده با تکرار چندین شستشو توسط آب مورد بررسی قرار گرفت. در انتهای بار پنجم شستشو، تا 71٪ از AFB_1 متصل باقی ماند و باکتری‌های غیرزنده *Lactobacillus rhamnocus*(ATCC 53103) , *L. rhamnosus*(DSM 7061), بیشترین مقدار AFB_1 را از محلول جدا کردند (20). تلقیح اسپورهای *A. flavus* در کشت *Streptococcus lactis* در محیط تریپتون براث باعث تجمع بسیار کم یا عدم تجمع آفلاتوکسین و جلوگیری از رشد قارچ، نتیجه شد (21). کاهش در pH و مقادیر مواد مغذی در محیط بر اثر رشد *S. lactis* دلیل این بازدارندگی آشکار نبود. بازدارندگی با اضافه‌کردن مقادیر مساوی هیدارت کربن مصرف شده توسط باکتری قبل از تلقیح قارچ، کاهش نیافت اما مقادیر آفلاتوکسین هنگامیکه *S. lactis* به کشت *A. flavus* در حال رشد اضافه شد، به طور مشخصی کاهش یافت. بعلاوه جهت جلوگیری از سنتز آفلاتوکسین، *S.lactis* توکسین تشکیل یافته را نیز تجزیه می‌کرد. این باکتری در اواخر فاز رشد خود بازدارنده‌ای تولید و به محیط ترشح می‌کرد که یک ترکیب با وزن مولکولی پایین و مقاوم به حرارت بود (21).

استفاده از باکتریهای اسید لاکتیک در کنترل بیولوژیکی قارچهای مولدآفلاتو کسین

آلودگی محصولات به آفلاتوکسین را می توان با برداشت به موقع و جلوگیری از آسیب‌های وارده توسط حشرات و نگهداری مناسب، به حداقل رساند. با این وجود حتی تحت کنترل و مدیریت بسیار دقیق هم، مقادیر غیرقابل انتظاری آفلاتوکسین بر اثر آسیب حشرات یا در معرض قرار گرفتن محصول با رطوبت قبل و یا بعد از برداشت و یا در طی نگهداری و نقل و انتقال و حتی مصرف آن، در محصول مورد نظر ایجاد می شود (22).

برای بسیاری از بیماریها، روشهای شیمیایی کنترل معمول همیشه به صرفه و موثر نیستند. روشهای ضدعفونی نیز همانند سایر روشهای شیمیایی کنترل ممکن است خطرهایی برای محیط زیست، سلامتی و ایمنی محصول داشته باشند. در دهه 1930 توانایی‌های ضدقارچی بعضی میکروب‌های مفید شناخته شد و تلاشهای بسیاری تا به امروز برای استفاده از آنها جهت کنترل بیماری گیاهی صورت گرفته است و به تازگی مصرف تجاری آنها متداول گردیده است.

آفلاتوکسین را نمی‌توان به سهولت از غذاهای آلوده با روش‌های سم‌زدایی، جدا کرد. بنابراین توجه خاص به گسترش روش کنترل بیولوژیکی وجود دارد تا بدین طریق بتوان ایمنی محصول را با کاهش سم موجود در آن افزایش داد و این امر را می‌توان بر مبنای جایگزین کردن ایزوله‌های سم زا با ایزوله های غیر سم زا یک گونه قارچی انجام داد. گزارشهایی مبنی بر مهار تولید آفلاتوکسین توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک، باسیلوس‌سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) و بسیاری از قارچها وجود دارد. این بازدارندگی می تواند در نتیجه عواملی نظیر رقابت برای موادغذایی، فضا (رقابت بر سر موادغذایی برای تولید نیاز است نه برای رشد) و تولید متابولیت های ضدآفلاتوکسین‌به وسیله میکروارگانیسم‌های همزیست باشد (22). تکنیک‌های متعددی برای نگهدارنده موادغذایی و غذای دامی به کار می‌رود. خشک کردن، منجمد کردن، نگهداری در سردخانه، نگهداری در شرایط تغییر یافته و تیمار حرارتی، همگی روشهای فیزیکی نگهداری موادغذایی هستند. بسیاری از افزودنیهای شیمیایی هم به عنوان نگهدارنده‌ها استفاده می‌شوند. با این وجود مکانیسم‌های دقیق یا هدف آنها، اغلب شناخته شده نیست (23). بسیاری از اسیدهای آلی به عنوان افزودنیهای موادغذایی استفاده می شوند که فعال‌ترین آنها اسیدهای لاکتیک، استیک، پروپیونیک، سوربیک و بنزویک هستند (23). بنزویک اسید و سوربیک اسید دارای طیف فعالیت وسیعی هستند (24). اسیدهای بنزویک و بنزوات سدیم به طور اولیه به عنوان عوامل ضدقارچی استفاده می‌شدند (23).

ناتامایسین یک عامل آنتی‌بیوتیکی تولید شده توسط *Streptomyces natalensis* است که بسیار در برابر مخمرها و قارچها مؤثر است و اغلب به عنوان یک نگهدارنده بر روی سطح پنیر سخت استفاده می‌شود (23).

افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های مقاوم شده به آنتی‌بیوتیکها، یک حقیقت غیرقابل انکار است. قارچها هم مستثنی نیستند و بسیاری از گونه‌های پاتوژن انسانی و فاسد کننده مواد غذایی نیز مقاوم شده‌اند. با این حال مخمرها و قارچها تنها به آنتی‌بیوتیکها مقاوم نشده‌اند بلکه به مواد نگهدارنده‌ای مثل اسید سوربیک و بنزویک، همانند تیمار شیمیایی با ترکیبات پاک کننده، نیز مقاوم اند. جمعیت قارچی اولیه می توانند اسید سوربیک در پنیر را تجزیه نمایند. تعدادی از گونه‌های *Zygosaccharomyces*, *Saccharomyces*, *Penicillium* در حضور سوربات پتاسیم رشد می کنند و آن را تجزیه نمایند (Davidsson, 2001). تعداد قارچهای تجزیه کننده سوربات در حال افزایش است. به علاوه گونه هایی مقاوم به بنزوات از *P. roqueforti* شناخته شده است.

قارچ *Penicillium discolor* اخیراً نسبت به مواد شیمیایی استفاده شده در فرآوری غذا نظیر ناتامایسین، مقاومت کسب کرده است. *P. discolor* می‌تواند بر روی غلظتهای بالای ناتامایسین رشد کند و بر روی پنیر سخت فساد ایجاد کند (25). مخمرهایی نظیر *Candida versatilis* , *Debaromyces hansenii* و *Torulaspora delbrueckii* ، نیز مقاومت بالایی به گندزداهای شیمیایی و ترکیبات پاک کننده در

محیط های لبنی نشان داده اند (26). ریسک بالایی استفاده از آنتی بیوتیکها و نگهدارنده ها، پدیده مقاومت را در آینده افزایش خواهد داد. بنابراین رسیدن به یک انتخاب و جایگزین خوب، ضروری است.

عموم مردم خواستار کاهش استفاده از نگهدارنده ها و افزودنیهای شیمیایی در مواد غذایی و محصولات آن هستند. در عین حال، مصرف کنندگان، خواستار مواد غذایی با کیفیت بالا، فاقد نگهدارنده، ایمن با فرآوری کم بوده که ماندگاری بالایی نیز داشته باشد. البته این مساله به راحتی قابل حل نیست. به علاوه قوانین حاضر، مصرف نگهدارنده‌های تأیید شده در مواد غذایی مختلف را محدود کرده است. مطالعه و تحقیق برای دست یابی به روش نگهداری جهت ممانعت از رشد قارچ های آلوده کننده یک امر ضروری به نظر می رسد.

باکتری های اسید لاکتیک به طور طبیعی در غذاها یافت می شوند و یا به شکل کشت‌های خالص به محصولات غذایی متعددی اضافه می شوند. آنها نه تنها تهدیدی برای سلامت انسان نیستند بلکه برای سلامتی انسانها به عنوان پروپیوتیک (Probiotics) مناسب نیز می باشند. LAB دارای تأییدیه GRAS (Generally Recognized As Safe) هستند و از قدیم به شکل یک مصرف کنندهٔ طبیعی و محافظ محیط زیست از مواد غذایی محافظت می کردند. 25٪ رژیم غذایی اروپایی‌ها و 60٪ رژیم غذایی بسیاری از کشورهای در حال توسعه شامل مواد غذایی تخمیری است (12) . LAB به عنوان استارت کالچر در تهیه محصولات لبنی نظیر ماست، شیرهای ترش، کره شیری، پنیرهای هلندی (Cottage cheese)، پنیرهای سخت (چدار و Edam) و پنیرهای نرم (Comembert , Brie) استفاده می شوند (1). باکتری های اسید لاکتیک استفاده شده در تخمیر شیر، به خصوص، *Lactococcus lactis* در بین سایرین بهتر شناخته شده اند. گونه‌های *Leuconostoc* و *Lactobacillus* نیز در ارتباط با محصولات لبنی می باشند (12).

وجود هم زمان باکتری های اسید لاکتیکی و قارچها برای بسیاری از کاربردهای بیوتکنولوژیکی نظیر تهیه خمیر ترش، که در آن نسبت باکتری های اسید لاکتیک به مخمر معمولاً 1 : 100 است، ضروری می باشد. علاوه بر این که LAB برای تولید بسیاری از محصولات غذایی و دامی ضروری است می‌توانند به عنوان ارگانیسم های فاسد کننده سبب ضرر اقتصادی نیز شوند. Makanjula و همکاران (1992) نشان دادن که *Lactobacillus plantatum* سبب فلوکولاسیون مخمر تخمیر می شوند و در نتیجه تولید اتانول را در تخمیر مشروبات الکلی کاهش می‌دهد.Khanafari و همکاران در سال 2007 کاهش میزان 77 درصدی آفلاتوکسین B1 را توسط *Lactobacillus plantarum* (PTTC 1085) در گیاه ذرت گزارش کردند. بررسی میکروسکوپی نمونه ذرت آلوده شده با اسپورهای قارچ *A. flavus* و تیمار شده با باکتری فوق حاکی از احاطه شدن اسپورهای قارچی توسط این باکتری و تخریب آن بوده است (28). همچنین آنها گزارش نمودند که باکتری فوق در دمای 37 درجه سانتیگراد در طی مدت زمان یک ساعت 45٪ و در 90 ساعت 100٪ آفلاتوکسین B1 را از محلول حذف می کنند در حالیکه نمونه اتوکلاو شده (کشته شده) باکتری فوق تاثیر چندانی در حذف توکسین فوق نداشته است (29).

استفاده از باکتریهای اسید لاکتیک دراستخراج رنگدانه های کارتنوئیدی:

کاروتنوئیدها ترکیبات محلول در چربی می‌باشند که عامل رنگ زرد و قرمز در بعضی از گیاهان و جانوران هستند. این رنگدانه ها شامل گروهی از هیدروکربنها به نام کاروتن‌ها می‌باشند و گروهی که دارای مشتقات اکسیژن می‌باشند زانتوفیل نام دارند. کاروتنوئیدها دارای 8 عامل ایزوپرنوئید بوده که آرایش آنها در مرکز مولکول معکوس است. در کاروتنوئید لیکوپن (Lycopene) ساختار اصلی کربنی به صورت دایره وار قرار گرفته و بتاکاروتن را می‌سازد. کاروتنوئیدهای دیگر دارای ساختار انتهایی متفاوت همراه با گروههای مشابه در مرکز مولکول می‌باشند. در مورد اشتراک کاروتنوئیدها با ترکیبات پروتئینی تحقیقات بسیاری صورت گرفته است. این اشتراک باعث پایدار شدن رنگدانه شده و رنگ آن را تغییر می‌دهد. برای مثال کاروتنوئید قرمز آستاگزانتین هنگامی که با پروتئین ترکیب می‌شوند باعث رنگ آبی در پوسته شاه میگو می‌شوند. مثال دیگر رنگدانه سبز رنگ موجود در تخمهای شاه میگو می‌باشد. ترکیبات کاروتنوئید- پروتئینی در بسیاری از برگهای سبز، باکتریها، میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند (30).

اهمیت کاروتنوئیدها

امروزه اهمیت کاروتنوئیدها بعنوان یک رنگ خوراکی تنها به داشتن منشأ طبیعی و نداشتن اثر سوء بر روی سلامتی مصرف کننده محدود نمی‌شود. در دنیای امروزی کاروتنوئیدها نقش عمده‌ای را در تهیه مواد دارویی، آرایشی، خوراکی و خوراک دام بازی می‌کنند. در حقیقت روند رو به افزایش مصرف این ترکیبات در صنایع گوناگون مرهون اکتشافات علمی در زمینه‌های مختلف درمانی و صنعتی می‌باشد. بطور کلی اهمیت کاربرد کاروتنوئیدها در رابطه با چهار مورد عمده یعنی بکارگیری این ترکیبات در صنایع غذایی، تغذیه و سلامت مصرف کننده به منظور پیش‌گیری از اثرات ترکیبات شیمیایی سرطانزا و نهایتاً در تغذیه دام و طیور مطرح می‌باشد.

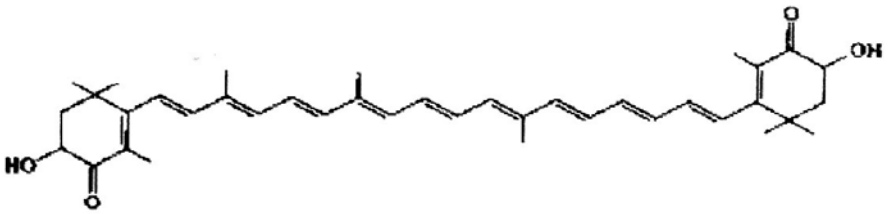
رنگدانه کاروتنوئیدی آستاگزانتین (Astaxanthin)

آستاگزانتین رنگدانه کاروتنوئیدی اصلی است که در جانوران آبزی یافت می‌گردد. این رنگدانه قرمز- نارنجی وابسته به گروه کاروتنوئیدهای شناخته شده‌ای مانند بتاکاروتن یا لوتئین است اما قدرت آنتی اکسیدانی آن 10 بار قوی‌تر از بتاکاروتن می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که آستاگزانتین به عنوان یک آنتی اکسیدان می‌تواند تا 1000 برابر قوی‌تر از ویتامین E باشد. آستاگزانتین در جانوران آبزی دارای عملکردهای بیولوژیکی بسیار مهمی از قبیل حفاظت علیه اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، حفاظت بر علیه اثرات نور ماوراءبنفش، فعالیت در جهت پیش‌سازی ویتامین A و حفاظت قدرت بینایی، تشدید پاسخهای ایمونولوژیکی، رنگدانه‌سازی، ارتباطات و

رفتار تولید مثلی و بهبود آن می‌باشد. در گونه‌هایی نظیر ماهی آزاد یا میگو آستاگزانتین برای رشد و بقای این موجودات ضروری به نظر می‌رسد و خواصی شبیه به ویتامینها از خود نشان می‌دهد (31).

ساختمان شیمیایی مولکول آستاگزانتین

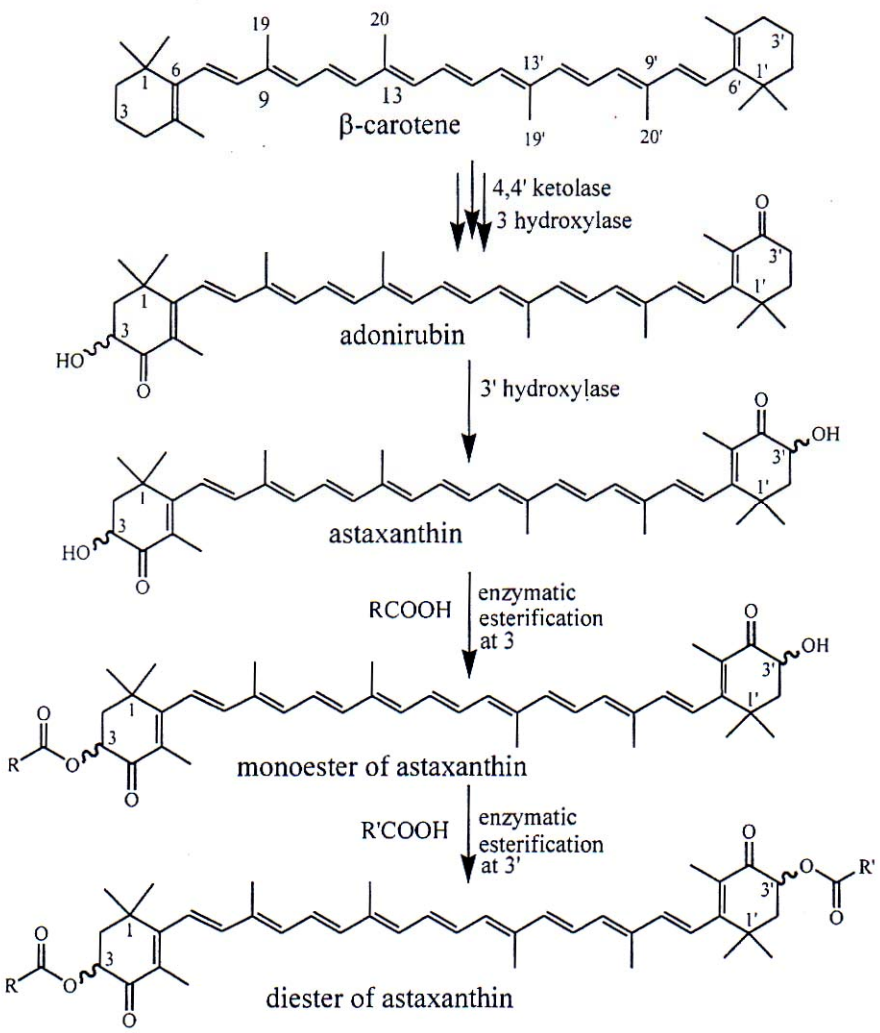
مولکول آستاگزانتین دارای دو کربن متقارن می‌باشد که در موقعیت‌های 3 و ''3 از حلقه‌های بنزوئیدی در دو انتهای مولکول قرار دارند. انانتیومرهای (Enantiomere) مختلفی با جابه‌جایی گروه‌های هیدروکسیل (OH) روی کربنهای متصل به این مراکز تقارن به وجود می‌آید. اگر گروه هیدروکسیل طوری به مولکول بچسبد که بالای صفحه مولکول قرار گیرد گفته می‌شود که در آرایش نوع R و هنگامی که گروه هیدروکسیل به پائین صفحه متصل باشد در آرایش نوع S قرار دارد. بنابراین 3 نوع انانتیومر RوR و SوS و SوR (meso) را شامل می شود.



شکل 1- فرمول شیمیایی مولکول آستاگزانتین

انواع مولکولهای آستاگزانتین

آستاگزانتین به صورتهای آزاد، منواستر و دی‌استر وجود دارد. فرم آزاد، فاقد گروههای هیدروکسیل 3 و ''3 بوده درحالیکه در فرم مونواستر یک اسید چرب به موقعیت 3 مولکول باند شده است و در فرم دی‌استر یک اسید چرب به هر یک از موقعیتهای 3 مولکول وصل گردیده است. مولکولهای منواستر و دی استر غیرقطبی می‌باشند در حالی که کاروتنوئیدهای آزاد غالباً قطبی هستند. معمولاً بیشترین مقدار مربوط به آستاگزانتین منواستر با فراوانی 70٪ ، دی استر 10 درصد و آستاگزانتین آزاد حدود 5 درصد می‌باشد (شکل 2).



شکل 2- مسیر تبدیل آستاگزانتین به مولکولهای منواستر و دی استر

بیوسنتز آستاگزانتین

آستاگزانتین از طریق مسیر پیرونوئیدی که مسئول سنتز بسیاری دیگر از مولکولهای حلال در چربی هستند مانند استرول، استروئید، پروستاگلاندین، هورمون، و ویتامینهای D و K و E تولید می‌شود. این مسیر با acetyl - CO - A شروع شده و از طریق phytoene ← lycopene ← $\beta-$ carotene و Cantaxanthin قبل از آخرین اکسیداسیون و در نهایت با تبدیل شدن به آستاگزانتین ادامه‌می‌یابد.

تخمیر لاکتیکی

کاروتنوئیدهای طبیعی جانشینی برای رنگدانه‌های نارنجی- قرمز مصنوعی می‌باشند. در سخت‌پوستان به صورت یک کمپلکس پروتئین - رنگدانه وجود دارند. برای اینکه این رنگدانه به شدت ناپایدار، استخراج شود ضایعات سخت‌پوستان باید پایدار گردد. تخمیر لاکتیکی یک راه ساده و از نظر محیط زیست مناسب است که از طریق آن می‌توان به این هدف رسید (32).

رنگدانه شامل 3 نوع استریویزومر می‌باشد که با پروتئینی ترکیب شده و در اسکلت خارجی سخت‌پوستان انباشته می‌گردند. این ترکیب رنگهای سبز، بنفش و آبی دیده می شود. این رنگدانه تحت تاثیر حرارت، به رنگ قرمز رویت می گردد. آستاگزانتین بدون پروتئین می‌تواند در بسیاری از محصولات مانند غذاها، غذای دام، مواد آرایشی و دارویی مورد استفاده قرار می گیرد. رنگ قرمز- نارنجی آستاگزانتین دلیل کیفیت بالا در غذاهایی مانند ماهی آزاد و قزل‌آلا می باشد. کاروتنوئیدهای طبیعی نقش مهمی در تولیدمثل ماهی دارد. در مکزیک تولید میگو جنس پنئوس در حدود 80.000 تن در سال می‌باشد که 60 درصد آن صادر می‌شود. تنها 55 درصد حیوان قابل خوردن و بقیه پوست و اسکلت خارجی و سروسینه حیوان می‌باشد. این اعضاء حدود 35.000 تن مواد زائد را در صنعت صید و پرورش تشکیل می‌دهند. ضایعات سخت‌پوستان برای تولید مواد با ارزشی مانند کیتین، آنزیم و رنگدانه به کار می‌رود. از آنجایی که ضایعات مقدار زیادی پروتئینی (47/7٪) و کلسیم (26/8٪) دارند پروتئین‌زدایی و مواد معدنی‌زدایی ضروری است. استخراج کتین به دلیل روش اسید - بازی برای طبیعت مضر است. به علاوه در اثر این فرایند رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به دلیل وجود اسید به شدت آسیب می‌بینند. یک روش جانشینی برای پروتئین‌زدایی سخت‌پوستان تخمیر با باکتری اسید لاکتیک است. در این روش پروتئین تا 50 درصد کاهش می‌یابد. اگر محصول نهایی کیتین باشد روش کم ضررتری می‌تواند انجام شود. تخمیر لاکتیکی پروسه‌ای است که می‌توان کاروتنوئید تولید شده به ویژه آستاگزانتین را از طریق پایدار کردن رسوبات به وسیله اسید استخراج کرد. آستاگزانتین از مواد زائد تخمیر شده پایدار همینطور از مایع تخمیری می‌تواند به وسیله استخراج حلالی به دست آید.

در سال Khanafari 2007 و همکاران استخراج آستاگزانتین از پوست میگوی خلیج فارس *Penaeus semisculcatus* به روش تخمیر لاکتیکی نشان دادند. تخمیر میکروبی با تلقیح دو سوش باکتری اسید لاکتیک *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 و *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 در محیط کشت حاوی پودر نمونه پوست میگو با استفاده از مداخله قند (لاکتوز)، عصاره مخمر، مخلوط هر دو و سرما ($-20^{o}C$) انجام شد. کاروتنوئیدها با یک سیستم حلال آلی برتر (هگزان – استن) استخراج گردیدند و پس از خالص‌سازی وجود آستاگزانتین به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) اسپکتروفتومتری، NMR و IR در ضایعات میگو اثبات شد و اثرات عوامل مداخله‌کننده در تخمیر میکروبی آن در حضور لاکتوباسیلوس مطالعه گردید. نمونه Rf های تولید شده از کروماتوگرافی لایه نازک با حلال هگزان – استون هنگام استفاده از قند لاکتوز 11 نوع Rf و هنگام افزودن عصاره مخمر 9 نوع Rf به دست آمد. هنگام استخراج میکروبی رنگدانه بوسیله لاکتوباسیلوس پلانتاروم با افزودن قند لاکتوز در درجه اول آستاگزانتین دی استر و سپس آستاگزانتین منواستر به ترتیب با Rf = 0/78 و قطر باند 0/60 و Rf = 0/53 و قطر باند 0/52 میلی متر تولید شد. نتایج IR در این تحقیق نشان داد که پیکهای مربوط به گروه OH و C = O و C - H و گروه متیل در این نمونه که Rf شماره 2 با میانگینی 0/53 می‌باشد، مربوط به کاروتنوئید آستاگزانتین است. نتایج NMR مربوط به باند 2 کروماتوگرافی لایه نازک با Rf معادل 0/53 ماهیت کاروتنوئیدی داشته و گروههای متیل مجاور پیوند دوگانه در ناحیه 2/07ppm و گروههای متیل آلیلی در ناحیه 1/21 ppm و گروههای متیل وینیلی در ناحیه 1/59 ppm می‌باشد. همچنین در ناحیه 2/07 ppm واجد گروه OH و در ناحیه 5/39 ppm گروه وینیلی وجود دارد. همچنین از نظر آماری مشخص گردید که سرما اثر معنی داری روی قطر باندهای حاصل در آزمایشات کروماتوگرافی لایه نازک و در نتیجه میزان تولید آستاگزانتین ندارد حتی باعث کاهش جزئی آن نیز می‌گردد. نتایج نشان داد که در روش میکروبی حلال هگزان و استن (1:3) بهترین حلال آلی برای استخراج رنگدانه بعد از تخمیر پودر میگو می‌باشد. مشخص گردید که لاکتوباسیلوس 1643 نقش بهتری در امر تخمیر و تولید محیط اسیدی در نتیجه افزایش میزان آستاگزانتین حاصله دارد. ولی تعداد Rf ها و در نتیجه تعداد باندهای کارتنوئیدهای جدا شده از میگو بوسیله لاکتوباسیلوس 1058 بیشتر می‌باشد. نتایج نشان داد که نقش قند لاکتوز از عصاره مخمر در استخراج آستاگزانتین بیشتر بوده و تعداد Rf های تولید شده هنگام استفاده از قند لاکتوز و باکتری لاکتو باسیلوس 1058 بیشتر است.نتایج استخراج به وسیله هر کدام از سه گروه حلال یکسان بود. مشخص شد استخراج به روش میکروبی کارایی بیشتری در تولید آستاگزانتین نسبت به روش شیمیایی دارد (33).

باکتریوسین و خواص ضدمیکروبی

در دو دهه اخیر، کاربرد پروبیوتیک ها برای جلوگیری و بررسی بی نظمی های گوارشی– روده ای مورد توجه قرار گرفته است (34). پروبیوتیک ها به عنوان میکروارگانیسم های زنده ای تعریف شده اند، که در مقادیر کافی، باعث سلامتی میزبان می شوند (35). اثرات مفید پروبیوتیک ها در میزبان حیوانی از طریق حفظ تعادل میکروبهای روده ای ثابت شده است. در گذشته پروبیوتیکها، به عنوان مکمل غذایی، در غذای حیوانات به کار برده می شد اما امروزه برای میزبان انسانی نیز کاربرد دارد. منبع اصلی پروبیوتیک ها برای انسان، لبنیات است اگرچه اطلاعات کمی در مورد اثرات سودمند پروبیوتیکها وجود دارد (36)، ولی آنها می توانند به عنوان سدهای میکروبی در مقابل پاتوژنهای گوارشی– روده ای با جلوگیری از اتصال پاتوژن، تغییر سیستم ایمنی و تولید ترکیبات آنتی باکتریال عمل نمایند (35).

دو گروه بزرگ از میکروارگانیسم ها که به عنوان پروبیوتیک از آنها استفاده می گردد، لاکتوباسیلها و بیفیدوباکتریوم ها می باشند (37). مهمترین گونه های لاکتوباسیل که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می گیرند، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ، لاکتوباسیلوس سلوبیوسوس ، لاکتوباسیلوس کازیی ، لاکتوباسیلوس کورواتوس ، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس ، لاکتوباسیلوس فرمنتوم ، لاکتوباسیلوس روتری ، لاکتوباسیلوس گاسری ، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم می باشند (38).

اثر حفاظتی لاکتوباسیلها در نگهداری غذاهای تخمیری بطور عمده به دلیل شرایط اسیدی است که در زمان رشد باکتری ها در غذا به وجود می آید. به تدریج کربوهیدرات ها به اسیدهای آلی (اسید استیک و اسید لاکتیک) به همراه کاهش pH ، باعث افزایش نیمه عمر و کیفیت خوب فرآورده های غذایی می شوند. این بازدارنده های طبیعی می توانند جایگزین مواد نگهدارنده شیمیایی نظیر نیتراتها و نیتریت ها، که اکثرا" عوارض جانبی به دنبال دارند، گردند. در دهه های اخیر مشخص گردیده که فعالیت بازدارندگی باکتری های اسید لاکتیک، به سیستم های پیچیده آنتاگونیستی تولید شده توسط کشت های آغاز گر بستگی دارد . باکتری های اسیدلاکتیک قادر به تولید و ترشح انواع مواد باز دارنده به غیر از اسید لاکتیک و اسید استیک هستند که اکثر آنها اثر بازدارندگی بر روی رشد بسیاری از میکروارگانیسمها دارند، لذا می توانند دارای قدرت نگهدارندگی باشند (39). این مواد به مقدار کمتری نسبت به اسید لاکتیک و اسید استیک تولید می شوند. برخی از این مواد در مقابل برخی از میکروارگانیسمهای پاتوژن غذایی و میکروارگانیسمهای فاسدکننده غذا مانند لیستریا کلستریدیومها و انتروکوکها ، برخی از باسیلوسها، استافیلوکک ها اثر بازدارندگی رشد دارند (40). در شرایط آزمایشگاهی و محیط زنده، آزمایشات متعددی بر روی آنتاگونیسم گونه های لاکتوباسیلوسهای مختلف در مقابل هلیکوباکتر پیلوری، کلستریدیوم دیفیسل، کمپیلوباکتر ژژونی و اشریشیاکلی صورت گرفته (41). لاکتوباسیلها با تولید باکتریوسین دارای فعالیتهای آنتی تومور، کاهش میزان کلسترول، واکنشهای شیمیایی وابسته به احیای نیترات و جذب گروههای ویتامین B را دارا می باشند (42)، فعالیت آنتی اکسیداتیوی نیز در باکتری های اسید لاکتیک گزارش شده است(43).

خنافری و همکاران در سال 1388 جداسازی 21 جدایه لاکتوباسیل از بیست نمونه ماست محلی با توان ضدمیکروبی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ویژه *لیستریا مونوسایتوجنز* به عنوان پاتوژن مواد غذایی را نشان دادند. در این تحقیق، حداکثر تولید لاکتوسین در فاز لگاریتمی رشد در محیط کشت تخمیری در دمای 37ºC و مدت زمان 32 ساعت حاصل شد. درحالی که تولید این ترکیبات در سه سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس رئوتری* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در ابتدای فاز رکود مشاهده شد (44).

باکتریهای اسید لاکتیک و ویتامین های گروه B

ترکیب میکروبی دستگاه گوارش انسان و میکروب های وارد شده از طریق غذا به دستگاه گوارش می توانند اثرات مفید یا مضری بر سلامت داشته باشند. شواهد فراوانی نشان می دهند که برخی از باکتری ها که برای تخمیر فرآورده های لبنی مانند ماست استفاده می شوند و تعدادی از میکروب های خاص و مفید دستگاه گوارش، اثرات قدرتمند ضدبیماری زایی و ضد التهابی دارند. این میکروب ها باعث

ارتقای مقاومت بدن نسبت به انواع میکروب های بیماری زا در روده می شوند که خود می تواند به عنوان درمان و پیشگیری در برابر بروز بیماری های ناشی از رشد و تکثیر این میکروب های بیماری زا باشد. فرآورده‌های "پروبیوتیکی"حاوی باکتریهای مفیدی هستند که پس از مصرف در روده ساکن می‌شوند و اثرات مفیدی در سلامتی انسان برجای می‌گذارند. پروبیوتیک‌ها به دو صورت مصرف می‌شوند: 1- به صورت مکمل‌های غذایی به شکل پودر، شربت یا قرص 2- به صورت مواد غذایی غنی شده با پروبیوتیک‌ها. توسعه کاربرد پروبیوتیک ها به منظور تعدیل ترکیب میکروبی دستگاه گوارش، دیدگاه های جدیدی را در مورد نقش آنها در سلامت و پیشگیری از بیماری ها ارائه کرده است. ترکیب مواد مغذی ماست همان ترکیب مواد مغذی شیر است که تحت تاثیر نوع و مدت تخمیر و نوع میکروب های به کار رفته کمی تغییر یافته است. اصولا فرآیند تخمیر باعث کاهش ویتامینهای شیر در مقایسه با املاح آن می شود، زیرا ویتامینها نسبت به تغییر عوامل محیطی بسیار حساس تر از املاح هستند. مهمترین عوامل موثر حین تخمیر که منجر به کاهش ویتامینها می شوند، شامل حرارت و پاستوریزاسیون، اولترافیلتراسیون، هم زدن و شرایط اکسیداتیو هستند. به علاوه نوع کشت میکروبی به کار رفته برای تخمیر نیز بر کاهش مقدار ویتامینهای شیر مؤثر است. گونه های باکتری اسید لاکتیک برای رشد و تکثیر به ویتامینهای گروه B نیاز دارند که مهم ترین آنها B12 است. برخی از گونه ها نیز قادر به سنتز B12 هستند. بنابراین، انتخاب دقیق گونه های باکتری به کار رفته برای تخمیر می تواند عامل مهمی در جهت پیشگیری از کاهش قابل توجه B12 در محصول نهایی باشد (45).

References:

Carr Frank J; Chill Don; Maida Nino; (2002). Ingenta Connect The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey, Critical Reviews in Microbiology, **28**(4): 281-370

1. Ross RP; Morgan S; Hill C; (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. Int J Food Microbiol. **79**(1-2):3-16
2. Lindgren and Dobrogosz; **(**1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations FEMS Microbiol. Rev.**87**: 149-164.
3. Brul S; Coote P; (1999)**.** Preservative agents; their mode of action and stress response. Int. J. Food Microbiol. **50**, 1-17.
4. Kontula P; Suihko M. L; Von Wright A; and Mattila- Sandholm T; (1999). The effect of lactose derivatives on intestinal lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. **82**, 249-256.
5. Nagler-Anderson C; (2001).27 Effects of Lactic Acid Bacteria and Fermented Milks on Eicosanoid. Biol Pharm Bull. **17**,1012–7
6. Axelsson L; (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology, 1-72.
7. Kandler O; (1983)**.** Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria Ant. v. Leeuwenhoek, **49**, 209–224.
8. Eklund T; (1989). Organic acids and esters. In Gould, GW (ed). Mechanisms of action of food preservation procedures: 196-200. Elsevier Applied Sciences. New York, USA.

9. Cabo A.F; Braber P.M.F; Koenraad J.; (2002). Inhibition of Penicillium nordicum in MRS medium by lactic acid, J. Food Prot. 62 (9):1435–1444.

10. Bullerman L.B; Tsai W.Y.J; (2002). Incidence and levels of Fu 2002. The Use and Effects of Lactic Acid Bacteria in Malting and Brewing, J. of Lactic Acid. Bacteria, **13** (134)**:** 37–45.

11. Stiles J; Penkar S; Plockova N; Chumchalova J; Bullerman L.B; (2002). Antifungal activity of sodium acetate and *Lactobacillusrhamnosus*. J. Food Prot*.,* **65**, 1188–1191.

12. Magnusson J; Strom K; Roos S; Sjogren J; Schnurer J; (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters,* **219**, 129–135.

13. Condon S; (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiology Reviews, **46**, 269–280.

14. Jay J.M; (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol*,* **44**, 525–532.

15. Piard J.C; Desmazaeud M; (1991). Inhibiting factors producedby lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end products. Lait, **71**, 525-541.

16. Lindgren S.E; Dobrogosv W.V; (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology Reviews, **87**, 149–164.

17. EL-Nezami H; Salminen H; Ahokas J; (1996). Biological control of food carcinogen using *Lactobacillus* GG. Nutr. Today, **31**:41–42.

18. EL-Nezami H; Kankaanpa¨a¨ H; Salminen S; Ahokas J; (1998a). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. Food Chem. Toxicol. **36**,321–326.

19. Peltonen K; El-Nezami; Haskard C; Ahokas J; Salminen S; (2001), Aflatoxin B1 Binding by Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria, J. Dairy Sci. **84**, 2152–2156.

20. Coallier-Ascah J; Idziak E.S; (1985). Interaction between *Streptococcus lactis* and *Aspergillus flavus* on production of aflatoxin. Appl. Environ. Microbiol**, 49**, 163–167.

21. Cotty P J; (1994). Influence of field application of an atoxigenic strain of A. flavus on the populations of A. flavus infecting cotton bolls and on the aflatoxin content of cottonseed. Phytopathol, 84, 1270-1277.

22. Davidson P.M; Post L.S; Branen A.L; McCurdy A.R; (1983). Naturally occurring and miscellaneous food antimicrobials. In: Antimicrobials in foods, New York, pp. 385–392.

23. Niessen L; Donhauser S; Weideneder A; Geiger E; Vogel H; (1992). Mycologische Untersuchungen an Cerealikn und Malzen im Zusammenhang mit dem Wildwerden (Gushing) des Bieres. Brauwelt*,* **132**, 702–714.

24. Nielsen P. M; Petersen D; Dambmann C; (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science, **66**, 642-646.

25. Lourens-Hattingh A; Viljoen BC; (2001). Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products. Food Res. Int. **34**: 791-796. Int. Dairy J. 15: 1289-1297.

26. Makanjuola D.B; Tymon A; Springham D.G; (1992). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives - Elsevier, 14, 351.

27. Khanafari A.; Soudi H.; Miraboulfathi M.; (20070. BIOCONTROL of *Aspergillus flavus* and AFLATOXIN B1 PRODUCTION IN CORN. Eng Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng., **4**(3):163-168.

28. Khanafari A.; Soudi H.; Miraboulfathi M.; Karamei Osboo R.; (2007). An In vitro Investigation of Aflatoxin B_1 Biological Control by *Lactobacillus plantarum*, Pakistan Journal of Biological Sciences, **10**(15): 2553-2556.

29. Fennerma O. R; (1976). Principles of food chemistry. MARCEL DEKKER, INC, New York Basel, 417 - 419.

30. Alejung P; Wadstream T; (1998). Oral Preparation for treatment of Helicobacter sp. Infections - comprises xanthophylls, especially astaxanthin esterified with a fattyacid and derived from the alga Haematococcus sp. World patent# 9837879.

31. Armenta - Lopez R; Guerrero I; Huertas. (2002). Astaxanthin Extraction from shrimp waste by lactic fermentation and Enzymatic Hydrolysis of the carotenoprotein complex. Journal of food science, **67**(3): 1002-1006.

32. Khanafari A; Saberi A; Azar M; Vosooghi Gh; Jamili Sh; Sabbaghzadeh B, (2007). Extraction of Astaxanthin Esters from Shrimp Waste by Chimical and Microbial Methods. *Iran. J. Environ.* Health. Sci. Eng, 4(2):93-98.

33. Ouwehand A.C., Salminen, S., Robert P.J; Ovaska J; Salminen E; (2003). Diseasedependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intstinal mucose. Clin. Diag. Lab. Immunol. **10**, 643-646.

34. FAO/WHO, (2001),"Evalution of health and nutritionaql properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria". Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health organization Expert consultation Report, Cordoba.

35. De Vuyst, L., B. Degeest, (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. **23**, 153-177.

36. Servin (2004). Antagonist activities of Lactobacilli and Bifidobacteria against microbial pathogens, FEMS Microbiol , Rev, **28**, 405-440.

37. Masson P; Morphams; (2001). Containing education nutrition probiotics and prebiotics. The pharmaceutical Journal. **666**(7132):118-121.

38. Kandler O; Nobert Weiss, (1989). Bergeys Mannual of systematic Bacteriology; **2**:sec.14, 1208-1234.

39. Ennahar S; Deachamrs N; (2000). Listeria effect of enterocin A produced by cheese-isolated Enterococcus faecium EFMOI relative to other bacteriocins. **88**(3), 449-457.

40. Strus M; Pakosz K; Goscinia H; Przondo Mordarska A; (2001). Antagonistic activity tract pathogens (Helicobacter pylori, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Closteridium difficle). Med Diew Microbiol, **53** (2):133-142.

41. Elmafa I; Heinzle C; Majichrzuk Foissy H; (2001). Influence of a probiotic yoghurt on the status of vitamin B (1), B (6) in the healthy adalt human. Am Nutr Metab, **45**(1):13-18.

42. Terhara M; Kurama S; Takemoto N; (2001). Prevention by lactic acid bacteria of the oxidation of human LDL. Bio Sci Biotechnol Biochem, **65**(8):1864-1868.

43. Khanafari A; Esmaeilzade M; Akhavan Sepahey A; (2009). Estimation of Lactacin Production Ability by Probiotics Separated from Local Yogurt. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, **4**(1):67-77.

44. Vafa M.R. (2009). Dairy Product and Lactic acid bacteria, Iran Medical Sciences University.

شناسه: OH1

اثر پروبیوتیکهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در موشهای BALB/c مبتلا به عفونت سیستمیک کاندیداآلبیکنس

حجاری طاهری فاطمه* ، ابولحسنی محسن، مهدوی مهدی، شکرگزار محمدعلی، بیات منصور**

کاندیدیازیس بدون شک یکی از مهمترین و شایعترین بیماری های قارچی فرصت طلب در انسان است. پروبیوتیک ها باکتری های با اثرات مفید میباشند و مطالعات متعددی اثرات ایمونومدولاتوری آنها را در طیفی از عفونتها نشان داده است. در این پژوهش اثرات ایمونولوژیک لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در موش های BALB/c مبتلا به عفونت سیستمیک کاندیدا آلبیکنس مورد بررسی قرار گرفت. تجویز روزانه پروبیوتیکها در موش های ماده Balb/c 6-8 هفته ای بمدت یکماه صورت گرفت. گروه های کنترل PBS استریل دریافت کردند. سپس میزان $10^6\times$ 2 کاندیدا آلبیکنس از طریق دم تزریق شد. سپس موشها با همان میزان پروبیوتیک به مدت 2 هفته درمان شده، 5 سر از موشهای هر گروه برای انجام تست های ایمونولوژیک نخاعی شده و پس از کشت طحال، میزان سایتوکاین های IL-4,IL-12,TGF-β و IFN -γ با تست الایزا مورد سنجش قرار گرفت. بقیه موشها برای بررسی مرگ و میر روزانه تحت نظر قرار گرفتند.نتایج حاکی از افزایش مقدار IL-12 تنها در گروه درمان با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود ولی سطح IL-4 و TGF-β در تمامی موشهای عفونی افزایش داشت. اختلاف آماری معناداری در میزان IFN –γ مشاهده نشد. همچنین پروبیوتیک ها بقای موشها را افزایش ندادند.یافته های ما نشان داد که پروبیوتیک ها به عنوان یک عامل پیشگیری کننده میتوانند موثر باشند ولی برای درمان از نظر ایمونولوژیک از کارائی لازم جهت مقابله با عفونت فرصت طلبی چون کاندیدا آلبیکنس که شرایط ایمونولوژیک حادی ایجاد مینمایند برخوردار نمی باشند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، کاندیداآلبیکنس، ایمونومدولاتور

Effect of probiotics, Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus *casei*, on BALB/c mice with systemic infection of *Candida Albicans*

Hajari taheri fatemeh,abolhassani mohsen, mahdavi mehdi, shokrgozar mohammadali,bayat mansour

Introduction & Objectives: candidiasis is one of the most important and widespread opportunistic fungal disease in human. Probiotics are bacteria with beneficial effect and many study showed their immunomodulatory effects on many infections. In this report we study the immunomudolatory effect of two probiotics on BALB/c mice with systemic infection of C.*Albicans.*

Material and methods: female balb/c mice(6-8 weeks old) were treated orally for a month with 2.4×108 of different probiotic daily. Control groups received PBS. Then mice were systematically infected with 2×10^6 Candida albicans via tail vein and then orally administration were continued for 2weeks. Then cytokine assay of spleen lymphocytes was performed and the production of cytokines IL-12, IL-4,TGF-β and IFN-γ was determined by ELISA. Also, their survival was monitored daily up to all mice died.

Results: our results showed there is no survival benefit from probiotic administration. In cytokine assay there is no differences between IFN-γ production between the groups and the control. However, in all the groups the amount of TGF-β and IL-4 increased significantly as compared with control groups. IL-12 increased significantly in mice which received *L.acidophillus* only.

Conclusion: These results showed that in mice model system with the schedule and dosage we used probiotics can be used as prophylactic but they are not effective for treated of Candida albicans systemic infection.

Key words: probiotic, candida albicans, immunomodulatory

شناسه: OH2

بررسی اثر دریافت ماست پروبیوتیک بر سلامت دستگاه تنفسی و گوارشی دختران نوجوان شناگر استقامتی

قدملی لیلی*، سالارکیا ناهید، زایری فرید ، صباغیان راد لیلا**

انستیتوتحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور، شعبه بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده علوم و تحقیقات

تمرینات شدید و فشرده‌ورزشکاران، باعث کاهش قدرت سیستم ایمنی ، افزایش احتمال ابتلا به عفونتهای بخش فوقانی دستگاه تنفسی ، ناراحتی های گوارشی و به دنبال آن خستگی مزمن و کاهش کارایی ورزشکار می شود. مطالعات معدودی در مورد تاثیر مواد پروبیوتیک درارتقای سیستم ایمنی و بهبود کارایی ورزشکاران در دوره تمرینات ورزشی و در مسابقات صورت گرفته است. هدف از این بررسی تعیین اثر دریافت ماست پروبیوتیک بر سلامت دستگاه تنفسی و گوارشی دختران نوجوان شناگر استقامتی تهرانی در سال 1388 بود.روش اجرای این مطالعه مداخله ای از نوع تجربی، تصادفی کنترل شده با دارونما بود. نمونه‌های مورد بررسی 46 دختر شناگر 11 تا 17 ساله عضو تیم های قهرمانی استخرهای تهران، شرکت کننده در مسابقات 400 و800 مترکرال سینه در سال 88-1387 بودند. افراد به طور تصادفی به 2 گروه تقسیم شدند. در طی دو ماه (8هفته)، یکی از گروهها (گروه مداخله) دریافت کننده‌ماست پروبیوتیک پگاه همراه نهار و شام و گروه دوم (گروه کنترل با دارونما) دریافت کننده همزمان مقدار مشابه از ماست معمولی بود. در تمام طول 8 هفته از همه‌آزمودنی ها خواسته شد تا علائم گوارشی ، عفونتهای تنفسی، میزان تمرینات به متر ، مصرف دارو و میزان مصرف فراورده توصیه شده را روزانه در پرسشنامه‌های مربوطه ثبت کرده و از خوردن ماست و سایر فراورده‌های پروبیوتیکی خارج از برنامه طرح اجتناب کنند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزارSPSS (Version 17) انجام شد.متوسط تعداد روزهای سپری شده با بعضی ازعلائم عفونتهای تنفسی از جمله خس خس و گوش درد در گروه مداخله وگروه کنترل به ترتیب 2/4 روز در برابر 4/3 روز (P=0/024) و 0/52 روز در برابر 1/6 روز (P=0/008) از نظر آماری معنی دار بود. میانگین تعداد دفعات ابتلا به عفونت های تنفسی و ناراحتی های گوارشی در گروه مداخله وگروه کنترل به ترتیب 1 روز در برابر 1/4 روز (P=0/009) و0/9 روز در برابر 0/6 روز (P=0/05) از نظر آماری معنی دار بود. در متوسط مدت زمان ابتلا به عفونتهای تنفسی و ناراحتیهای گوارشی در دو گروه مورد مطالعه پس از 8 هفته مداخله تفاوت معنی دار دیده نشد. مصرف ماست پروبیوتیک باعث کاهش تعداد دفعات ابتلا به برخی علائم عفونت های تنفسی و کاهش طول دوره درگیری با بعضی از علائم همچون خس خس و گوش درد شد. کاهش علائم مشکلات گوارشی ورزشکاران به دنبال مصرف این نوع ماست از لحاظ آماری معنی دار نبود. انجام مطالعات بعدی برای بررسی نقش پروبیوتیک ها بر وضعیت سلامت تغذیه ای و عملکرد ورزشکاران در رشته های مختلف ورزشی ضروری به نظر می رسد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، عفونت های تنفسی، ناراحتی های گوارشی، شناگران

The effect of probiotic yogurt intake on the health statues of respiratory and digestive system of endurance young adult women swimmers

Ghadamli Leili*, Salarkia Nahid, , Zaeri Farid, Sabaghian Rad Leila**

National Nutrition and Food Technology Research Institute, International Branch of Shahid Beheshti Medical University, Tehran, IRAN

Introduction: Intensive exercise and strenuous physical training can affect the immune system and make elite athletes vulnerable to respiratory viruses and coughs and colds. Few studies have been made on the role of the probiotics in improvement of athletes' capability during the exercise period and the competitions. This study was carried out to determine the effect of receiving probiotic yogurt on health statues of Tehrani juvenile athletic girls involved in the endurance swimming during 2009.

Methods:In a randomized controlled trial 46 girl endurance swimmers aged 11 to 17 years with mean age 13.8 ±1.8 years, weight 48.6± 7.5 kg and height 159 ±5.6 cm, who had taken part in the national 400 and 800 m crawl swimming competitions of 2009, were studied. The subjects were randomly selected to two groups as follows: 1: Receiving 400 ml yogurt probiotic containing 4×10^{10} cfu/ml (Colony forming unit per millimeter) comprising of Lactobacillus Acidophilus SPP, Lactobacillus Delbrueckii Bulgaricus, Bifidobacterium Bifidum, and Streptococcus Salivarus Thermnophilus, (n=23) and group 2: Receiving similar dose of ordinary yogurt, as a control (n=23). All the people subject were asked to record daily on the provided questionnaires, the digestive symptoms, respiratory infections, extent of exercise per meter, intake of medicine, and quantity of the consumed foodstuff product which had been recommended. They were advised to refrain from other probiotic products which were outside the project plan.

Results: The average number of days elapsed while accompanied by such symptoms as chest ailing breath by sound, and ear pain revealed in the intervention and control groups, were 2.4 versus 4.3 days, respectively (P = 0.024) ; and 0.52 versus 1.6 days (P= 0.008), which were statistically significant. After 8 weeks intervention, no significant difference was noted in the two studied groups as to average number of days during which the symptoms of respiratory infections and digestive problems including nose inflammation and congestion, fever, throat irritation, cough, stomachache, nausea and diarrhea. Average number of sequences which such symptoms as respiratory infections and digestive problems reported for the intervention and control groups were 1 versus 1.4 days, respectively (P = 0.009), and 0.9 versus 0.6 day (P =0.05), which were statistically significant. After 8 weeks of intervention, no significant difference was notices during the average period of exposure by the two studied groups to the respiratory infections and digestive problems.

Discussion: Consumption of probiotic yogurt resulted in reduction of sequence of exposure to symptoms of respiratory infections, and reduction in duration of suffering such symptoms as chest ailing breath by sound, and ear pain. The results showed the athletes who take probiotics stay healthier overall. It is necessary to plan the athlete's regime carefully and to make sure they eat properly. Further studies are required to be elaborated on the effects of the probiotic nutrition on athletes' health and performance.

Key Words: Probiotic, Respiratory infections, Digestive symptoms, Swimmers

شناسه: OH3

بررسی اثر مصرف ماست پروبیوتیک حاوی لاکتوبا سیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریا بر میزان کلسترول سرم افراد مبتلا به هیپرکلسترولمی (خفیف تا متوسط) شهرستان شیراز

باروتکوب عبدالامیر[1] . جولایی حسن[2] . روشن ضمیر مهدی[1]و حنیف پور محمد امین [1]

1–شرکت شیرپاستوریزه پگاه فارس، 2–دانشگاه علوم پزشکی شیرازRoshan1350@yahoo.com

بیماری های قلبی و عروقی مهمترین عامل مرگ و میر در بسیاری از کشورهای دنیا و همچنین ایران است (1) بر طبق آمار موجود حدود 40 درصد از مرگ و میر در ایران بر اثر این بیماری ها حادث می گردد(2)از مهمترین عوامل افزایش خطر بیماری های قلبی ، هیپرکلسترولمی است

(1). طبق بررسی های انجام شده میزان شیوع هیپرکلسترولمی در ایران در افراد بالاتر از 15 سال 11/1 درصد گزارش شده است (3) از آنجا که هر 1٪ کاهش کلسترول موجب 2/3٪ کاهش خطر بیماری های کرونر قلبی می گردد بنابراین کاهش کلسترول خون یکی از بهترین راه های جلوگیری از میزان مرگ و میر ناشی از این بیماری در ایران خواهد بود .

(2)رژیم درمانی ، مداخله غذایی و استفاده از داروهای کاهنده کلسترول از جمله راه های درمانی است (3) استفاده از زیست یارها (Probiotics) نیز به عنوان یکی ازعوامل کاهنده کلسترول خون در حال بررسی است . زیست یارها (Probiotics) میکروبهای مفیدی هستند که نقش های مفیدشان در ایجاد و نگهداری و سلامت انسان ها طی مطالعات متعدد به اثبات رسیده است .

این میکروارگانیسم ها پس از استقرار و رشد در روده ها (خصوصاً بخش انتهایی روده بزرگ) باعث ایجاد تعادل بین میکروبهای مفید و مضر گردیده و از این طریق اثرات مفیدی را در بدن انسان خصوصاً در دستگاه گوارش از خود نشان می دهند (4) کاهش کلسترول خون یکی از فوایدی است که به این باکتریها نسبت داده اند .

مطالعه به صورت کارآزمایی متقاطع تصادفی بر روی 46 فرد 67–20 سال با سطح کلسترول 304 mg/dl–200 انجام شد به این افراد در ابتدا به مدت 4 هفته به میزان روزانه 200 سی سی شیر استریل داده شد و از آنها خواسته شد که ازماست استفاده نکنند.

سپس مطالعه در دو گروه شامل گروه 1: کارکنان دانشگاه علوم پزشکی شیراز(25 نفر) و گروه 2: کارکنان شرکت شیر پاستوریزه پگاه فارس(21) نفر آغاز گردید. در ابتدای مطالعه از کلیه افراد دو گروه آزمایش خون جهت اندازه گیری کلسترول تام (Total cholesterol) و اندازه گیری TG,HDL,LDL انجام گردید و نتایج ثبت گردید.

در 6 هفته اول مطالعه گروه 1 روزانه 300 گرم ماست پروبیوتیک (حاوی لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس و بیفیدو باکتریا + باکتریهای استارتر ماست) دریافت کردند و به طورهمزمان گروه 2 روزانه 300 گرم ماست معمولی (حاوی باکتریها استارتر ماست شامل لاکتولاسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس) دریافت کردند .

قبل از انجام مطالعه دوم مجدداً آزمایش خون از کلیه افراد دو گروه جهت اندازه گیری سطح کلسترول تام TG,HDL,LDL انجام گردید. سپس جای دو گروه با هم تعویض گرید و گروه1 ماست معمولی و گروه 2 ماست پروبیوتیک به میزان روزانه 300 گرم دریافت کردند. و در انتهای این دوره نیز آزمایش خون از کلیه افراد جهت اندازه گیری سطح کلسترول تام ، TG,HDL,LDL انجام گردید.نتایج آزمایشات چهار گانه شامل 1- ابتدای مطالعه 2- پس از شش هفته اول مطالعه 3- آغاز شش هفته دوم مطالعه 4- پس از شش هفته دوم مطالعه نشان می دهد که مصرف ماست پروبیوتیک باعث کاهش کلسترول تام ، LDL و افزایش HDL می گردد.

اما در مقایسه ماست پروبیوتیک و ماست معمولی کاهش LDL به صورت آماری معنی دار است (P = 0/003) مصرف ماست حاوی باکتریهای پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفید باکتریا) باعث کاهش کلسترول تام LDL و افزایش HDL می گردد. و در مقایسه مصرف ماست پروبیوتیک و ماست معمولی میزان کاهش LDL به صورت آماری نیز معنی دار است بنابراین مصرف ماست پروبیوتیک جهت کاهش LDL توصیه می گردد.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ، بیفیدو باکتریا ، کلسترول تام ، LDL و HDL

The effects of probiotic yoghurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacteria consumption on the serum cholesterol level in hypercholestromic cases (mild to moderate) in Shiraz, southern Iran

Baroutkoub Abdolamir[1] , Dr. Julayi Hassan[2] , Roshanzamir Mehdi[1]*, .Hanif pour Mohammad amin[1]**
roshan1350@yahoo.com

1 Fars Pegah Pasteurized milk Co.32th Km Shiraz Takhte jamshid Shiraz Iran,2 Iran, Shiraz Medical sciences university, Shiraz Iran,(2008)

Introduction: Cardiovascular diseases is the most serious cause of mortalities in most countries including Iran (1). As statistics shows, about 4% of the deaths in Iran are due to such diseases (2). Hypercholestromia is among the remarkable aggravating factors in cardiovascular diseases (1). According to the reported studies, the prevalence rate of it among individuals over 15 years of age is 11% (3). As demonstrated, each 1% reduction of the cholesterol level results in 2.3% reduction of the coronary related risks. Therefore, lowering the cholesterol level can best serve in reducing the mortalities caused by the diseases in Iran.

Diet therapy, food intervention and use of cholesterol lowering agents are among the treatments recommended (3). Similarly, probiotics are being investigated as lowering agents. Probiotics, the useful microbes, play a critical role in sustaining health condition as revealed in a number of studies. These microorganisms can create a balance between the

useful and harmful microbes, once they are settled in the intestines (particularly the distal end of large intestine) and as a result leave positive impacts on the organs and especially the digestive tract (4).

Methods:The present cross sectional prospective study was carried out with 46 randomly selected individuals of the age range 20-64 years and with cholesterol level of 200-304 mg/dl. Initially, they received 200 cc sterilized milk per day for 4 consecutive weeks and were instructed not to consume yoghurt. The subjects (46) consisted of 25 personnels from Shiraz university of medical sciences and Fars Pegah Pasteurized milk company staff (21). At the beginning blood samples were collected from the subjects (46) for measuring total cholesterol, TG, LDL and HDL levels. The results were recorded for later analysis.

Group A received 300 gr/day probiotic yoghurt for 6 weeks and simultaneously Group B received normal yoghurt of the same amount for the same interval. It is worth mentioning that prior to the second phase of the study, blood sampling was done on all the subjects in both groups for measuring total cholesterol, TG, HDL and LDL levels). In the next round, the two groups reversed their consumption patterns i.e., Group A received normal yoghurt and Group B received probiotic yoghurt. Again blood samples were collected and analyzed.

Results:The results of the four rounds of procedures (i.e., at the beginning and prior to the consumption, six weeks after the initiation of the treatment, at the beginning of the second six weeks and finally after the second six weeks) were indicative of the reducing effects of probiotic yoghurt on the total cholesterol, LDL levels and raising effect on HDL. The difference between the reduced levels of LDL in probiotic and normal yoghurt treatments was statistically significant (P=0.003)

Conclusion:The consumption of the yoghurt containing probiotics Lactobacillus acidophilus and Bifidobacteria results in the decreased levels of total cholesterol, LDL and increased level of HDL. Thus, it could be suggested that probiotic yoghurt replace the normal type because of its reducing effect on LDL.

Key words: Lactobacillus acidophilus, Bifidobacteria, total cholesterol, LDL, HDL

شناسه: OH4

اثر پروبیوتیک بومی ایران بر ترمیم زخم پوستی در موش صحرایی

زاهدی فریما[1*] ، حیدری نصرآبادی میترا[2] ، تاج‌آبادی ابراهیمی مریم[3] ، شعبانی محمد[4] ، ابوطالبی هلیا[1]**

دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان zahedi.farima@Gmail.com

استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز، استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران

مدیریت زخم‌های پوستی، موضوعی مهم در پزشکی می‌باشد. عوامل شیمیایی متفاوت دارای اثرات جانبی در ترمیم زخم هستند و به همین منظور، امروزه گرایش به سمت استفاده از داروهای سنتی بیشتر شده است. جهت ارتقاء این علم، شاید بتوان از باکتری‌های پروبیوتیک برای بهبود روند ترمیم زخم استفاده کرد. باکتری‌های پروبیوتیک دارای سویه‌ها و گونه‌های متعددی می‌باشند اما تنها تحقیق انجام شده تا به امروز، روی باکتری کفیر بوده است.

هدف از این آزمایش، مطالعه اثر پروبیوتیک‌های بومی ایران بر ترمیم زخم پوستی می‌باشد.سویه لاکتوباسیل جدا شده از محصولات لبنی- سنتی ایران از نظر تولید اگزوپلی‌ساکارید با روش فنول سولفوریک بررسی شدند.

لاکتوباسیلوس برویس که تولید اگزوپلی‌ساکارید بالایی داشت، انتخاب گردید. برشی در پشت موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار که شامل گروه‌های تجربی، کنترل و کنترل منفی هستند، ایجاد شد. دو گروه کنترل و تجربی به ترتیب تحت درمان موضعی با اوسرین و اوسرین حاوی لاکتوباسیلوس برویس قرار گرفتند اما گروه کنترل منفی درمانی دریافت نکردند.

مساحت زخم هر 3 روز یکبار اندازه‌گیری شد. زخم پوستی موش‌ها به ترتیب پس از کشته شدن در روزهای 1، 7 و 21 برداشته و تحت مطالعات بافت‌شناسی و آماری قرار گرفت. درصد بهبودی زخم و التهاب در گروه تجربی نسبت به گروه‌های کنترل وکنترل منفی دارای اختلاف معناداری بود. یافته‌های پاتولوژیک در بررسی نمونه های اخذ شده از موارد تجربی، کنترل و کنترل منفی، از نظر هیستولوژیک، حکایت از روند کیفی نسبتا مشابه از نظر سرعت روند ترمیم و پاکسازی ناحیه ترمیم زخم با توجه به توالی زمانی نمونه‌ها با رنگ آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین داشتند.
یافته‌های فوق نشان دادند که لاکتوباسیلوس برویس به طور معناداری روند بهبود زخم پوستی در موش صحرایی را افزایش داد.

واژگان کلیدی: ترمیم، زخم پوستی، پروبیوتیک، اگزوپلی‌ساکارید، لاکتوباسیلوس برویس

Effect of Domestic Iranian Probiotic on Cutaneous Wound Healing in Rats

Zahedi, F[1*]; Heydari nasrabadi, M.[2] ; Tajabadi ebrahimi, M.[3]; Shabani, M.[4]; Aboutalebi, H[1]**

M.S student of Islamic Azad University of Damghan, zahedi.farima@Gmail.com

Assistant professor of Islamic Azad University of Parand

Assistant professor of Islamic Azad University of Tehran Central branch

Assistant professor of Iran University

INTRODUCTION: Management of cutaneous wounds is an important subject in medicine. Various chemical agents have side effects on wound healing; hence, there is much interest in using traditional medicine. In order to increase this science, it may be helpful to use Probiotic bacteria in wound healing treatment rate.Probiotic bacteria have various species, but, the only research which has been done since now on Kefir bacteria. The goal of the present research is investigating the effect of domestic probiotic bacteria of Iran on wound healing treatment.

MATERIALS AND METHODS: 22 strains of lactobacillus isolated from dairy-traditional products of exopolysaccharide production are investigated by phenol-sulfuric acid method. *Lactobacillus Berevis,* which has high exopolysaccharide(EPS) production, was selected. Cutting was created in the back of Wistar male rats that contain experimental, control and negative_control groups (n=5). Two groups, control and experimental, received eucerin and eucerin with *lactobacillus Berevis,* respectively, but the negative_control group had no treatment. The area of wound was measured each three days. the cutaneous wound of mice have been removed after they have been killed in day 1, 7 and 21,histological and statistical studies have been performed on them, respectively.

RESULTS: Wound healing percent and inflammation in experiment group has a meaningful difference with control and negative-control group. Pathologic finding in the investigation on specimens of experimental, control and negative control group, show similar rate of healing and wound region clining according to the hematoxilin and eosin staining.

CONCLUSION: The above results show that *lactobacillus Berevis* significantly increases the healing rate of cutaneous wound in rats.

Key words: healing, cutaneous wound, probiotic ,exopolysaccharid, *lactobacillus Berevis*

شناسه: OH5

بررسی پروبیوتیک ها بر فلور روده

میردامادی سعید [1]، مصطفوی سپیده [2]*، غیاثی مجتبی [2] ، آقا قزوینی شادی [1]**

** دانشیار سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران، Mirdamadi@irost.ir

1–سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران پژوهشکده بیوتکنولوژی، 2– آزمایشگاه بیمارستان فوق تخصصی لاله

مدفوع نوزادان استریل می‌باشد اما فوراً بعد از تولد بوسیله باکتریها کلونیزه می‌شود. در نوزادان1 تا 2 روزه انتروکک‌ها یا کلستریدیوم به سرعت زیاد شده و غالب می‌شوند. تحقیقات نشان می دهد که در پاسخ به افزایش پروبیوتیک ها کلی فرم‌ها و دیگر باکتریها رشدشان محدود می‌شوند . 99٪ باکتریهای مدفوع نوزادان که از شیر مادر تغذیه می کنند بیفیدوباکتریها تشکیل می‌دهند. این درحالی است که در نوزادانی که از شیر مادر تغذیه نمی کنند این رقم به 95٪ می‌رسد. دراین تحقیق 100 نمونه از بیماران دارای مشکلات گوارشی که به آزمایشگاه تشخیص پزشکی مراجعه نمودند مورد ارزیابی و ازمایشات افتراقی باکتریولوژیک قرار گرفت.21 مورد کودکان زیر 1 سال ، 21 مورد کودکان 1 تا 2 سال و مابقی افراد بالغ بودند. از نمونه های مورد آزمایش سویه های مختلف انتروباکتریاسه و انتروکک ها بوفور جداسازی گردید.

در نوزادان مورد بررسی بیشترین باکتریهای جدا شده پرتئوس ، اشرشیاکلی ، کلبسیلا دیده شد. در کودکان یک تا دو سال فلور غالب اشرشیا کلی ، سیتروباکتر و انتروکک و 2 نمونه سالمونلا ، در افراد بزرگتر انواع مختلف انتروباکتریاسه و در افراد تحت درمان با انتی بیوتیک سویه های کاندیدا نیز دیده شد. بر این اساس سویه های استاندارد (Test strain) برخی سویه های پاتوژن از قبیل لیستریا منوسیتوژنز (*Listeria monocytogen* PTCC 1303) ، اشرشیاکلی (*E.coli* PTCC 1338) ، استافیلوکک ارئوس (*Staphylococcus aureus* PTCC 1337) انتخاب و سویه استاندارد حساس به انتی بیوتیک میکروکوکوس لوتئوس (*Micrococcus luteus* PTCC 1110) به عنوان سویه نشانگر وجود مواد ضد میکروبی تولید شده بوسیله پروبیوتیک ها انتخاب و اثر پروبیوتیکی بیفیدوباکتر ، لاکتو کوکوس لاکتیس بر آنها بررسی گردید. نتایج حاصل از بررسی invitro ما نشان داد پروبیوتیک ها کاملا لیستریا منوسیتوژن و استاف ارئوس را در محیط با سرعت متفاوت از بین برده و رشد اشرشیا کلی را کاملا متوقف می نماید. لذا لزوم استفاده از پروبیوتیک ها در غذا بخصوص دررژیم غذایی نوزادان ، کودکان و افراد مسن و یا تحت درمان (افراد دارای ضعف سیستم ایمنی) ضروری بوده و در غذای کلیه افراد جامعه نیز مفید می باشد.

کلمات کلیدی : پروبیوتیک ؛ دستگاه گوارش ، میکروفلور، اثر بازدارندگی ، میکروارگانیسم های بیماریزا

شناسه: OH6

اثر ترمیمی لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداشده از پنیر سنتی ایران بر زخم معده ناشی از اسید استیک در موش صحرایی

ابوطالبی هلیا[1*]، دکتر حیدری نصرآبادی میترا[2]، دکتر تاج‌آبادی ابراهیمی مریم[3]، دکتر شعبانی محمد[4]، زاهدی فریما[5]**

1. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان helia_aboutalebi@yahoo.com 31، 2. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، 3. استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، 4. استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران، 5. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

پروبیوتیک‌ها، کشت میکروارگانیسم‌های زنده‌ای است که اگر به تعداد کافی مصرف شوند، با حفظ تعادل جمعیت میکروبی بومی روده روی سلامت مصرف کننده اثرات مطلوبی می‌گذارند. یکی از مهمترین گروه‌های پروبیوتیک، باکتری‌های لاکتیک اسید هستند، که بطور معمول در مایه‌ی محصولات لبنی استفاده می‌شوند. عمل باکتری‌های لاکتیک اسید وابسته به گونه و سویه‌ی خاص می‌باشد و بستگی به میزان کافی باکتری حاضر در روده‌ها دارد. پیچیدگی در شناسایی و طبقه‌بندی سویه‌ها، از آنجاییکه منافع فقط ممکن است متعلق به سویه-های خاص باشد، تحقیقات را مشکل کرده است. هدف مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر پروبیوتیک سویه‌ی لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداشده از پنیر سنتی ایران بر ترمیم زخم معده می‌باشد. سویه لاکتوباسیل جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران که توانایی رشد و بقاء در سیستم گوارشی آنها در مطالعات قبلی بررسی شده بود از نظر تولید اگزوپلی ساکارید با روش فنل سولفوریک بررسی شدند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم که اگزوپلی‌ساکارید تولیدی بالایی داشت انتخاب گردید. برای بررسی اثر این پروبیوتیک موش‌های صحرایی نر از نژاد ویستار به گروه‌های هفت‌تایی تجربی، کنترل و کنترل منفی تقسیم شدند. موش‌ها پس از تحمل بیست و چهار ساعت گرسنگی، تحت عمل جراحی قرار گرفتند. زخم معده توسط 0.12 میلی‌لیتر اسیداستیک(60% v/v) ایجاد شد. یک روز پس از جراحی گروه‌های تجربی، ماده تلقیح شامل 10^{10}cfu/day لاکتوباسیلوس پلانتاروم محلول در شیر، گروه‌های کنترل شیر استرلیزه فاقد باکتری و کنترل منفی نرمال سالین به طریقه‌ی گاواژ برای چند روز متوالی دریافت کردند. موش‌ها پنج و چهارده روز پس از القای زخم معده کشته، معده آنها خارج و ابعاد زخم (mm^2) محاسبه شد. پس از بافت‌شناسی، میزان اثر این پروبیوتیک بر ترمیم زخم معده در هر موش تعیین گردید.لاکتوباسیلوس پلانتاروم ابعاد زخم را نسبت به دو گروه کنترل و کنترل منفی به‌طور معناداری کاهش و ترمیم زخم معده را افزایش داد.لاکتوباسیلوس پلانتاروم دارای اثر ترمیمی قابل‌ملاحظه بر زخم معده ناشی از اسید استیک در موش صحرایی می‌باشد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، زخم معده، ترمیم

Healing Effect of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Iranian Traditional Cheese on Acetic Acid Induced Gastric Ulcer in Rats

Aboutalebi, Helia.[1*] ; Heydari nasrabadi, Mitra.[2] ; Tajabadi ebrahimi, Maryam.[3] ; Shabani, Mohammad.[4] ; Zahedi, Farima.[5]**

1. MSc student in Islamic Azad University of Damghan , helia_aboutalebi@yahoo.com

2. Assistant professor in Islamic Azad University of Parand

3. Assistant professor in Islamic Azad University of Tehran Central

4. Assistant professor in Iran University of Medical science

5. MSc student in Islamic Azad University of Damghan

Islamic Azad University of Damghan

Introduction: Probiotics are defined as “living organisms which upon ingestion in certain numbers exert health benefits beyond inherent basic nutrition. One of the most significant groups of probiotic organisms are the lactic acid bacteria, commonly used in fermented dairy products. The actions of lactic acid bacteria are species and strain specific, and depend on sufficient numbers of bacteria being available in the intestines. The difficulty in identifying and classifying strains has complicated research, since benefits may only pertain to particular strains.

The aim of the present study is to investigate the effect of a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* isolated from Iranian traditional cheese on gastric ulcer healing.

Matherials and methods: 22 strains of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional cheese had been investigated for exopolysaccharide (EPS) production by phenol-sulfuric acid method Which had been before approved for the ability of survival and growth in digestive system. To determine the effect of this probiotic strain, wistar male rats divided into 3 groups; experimental, control and negative control(n=7). Rats were deprived of food but not water for 24 hours and gastric ulcers were induced by luminal application of 0.12ml acetic acid solution(60% v/v). One day after ulcer induction, the experimental groups received sterilized milk with *lactobacillus plantarum* at concentration of 1×10^{10}cfu/day, the control groups received sterilized milk and the negative control groups received normal saline through oral gavage for few consecutive days. Rats were sacrificed on days 5 and 14 after ulcer induction and the ulcer sizes(mm2) were summed. After histological works the effect of this probiotic on gastric ulcer healing were determined in each stomach.

Results: *lactobacillus plantarum* significantly decreased gastric ulcer area compared to control and negative control groups and increased ulcer healing.

Conclusion: *lactobacillus plantarum* showed significant effects on gastric ulcer healing induced by acetic acid in rats.

Keywords: probiotics, *lactobacillus plantarum,* gastric ulcer, healing

شناسه: OH7

بررسی مقاومت نسبت به اسید و نمک های صفراوی وتوانایی دکانژوکه کردن نمک های صفراوی توسط لاکتوباسیلوس‌ها

نوربخش هیمن [1*، **]، بیطرف مونا [1] و خدائیان فرامرز [2]

1؛ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران hnourbakhsh@ut.ac.ir

2؛ استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران

سطح بالای کلسترول با وقوع بیماریهای قلبی ارتباط دارد. گزارش شده‌است که پروبیوتیکها در حضور نمکهای صفراوی از طریق دکانژوکه کردن آنها قادر به‌کاهش کلسترول می‌باشند. در این تحقیق لاکتوباسیلوس رئوتری(DSM20016)،لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس(DSM 20079) و لاکتوباسیلوس کازئی(DSM 20011) از نظر مقاومت به اسید و نمک صفراوی و نیز توانایی دکانژوکه کردن نمک (عوامل موثردر کاهش کلسترول) مورد مطالعه قرارگرفتند.فیلتر دیسک‌های تلقیح شده با باکتری روی محیط MRS آگار محتوی 0/5٪ نمک صفراوی sodium taurocholate قرار داده‌شد. پلیت‌ها به مدت 72 ساعت در 37°C گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله ایجادشده به عنوان شاخص کیفی میزان دکانژوکه‌کردن تعیین گردید. جهت بررسی مقاومت باکتری به نمک، 10٪ مایه تلقیح به محیط کشت MRS براث محتوی 0/3٪ نمک صفراوی oxgall اضافه‌ودر 37°C گرمخانه گذاری شد. رشد باکتری هرساعت از طریق اندازه گیری جذب در طول موج 620 nm بررسی شد. مقاومت باکتری به اسید از طریق کشت در محیط MRS براث با pH 2 بررسی گردید. کشت‌ها به مدت 2 ساعت در دمای 37°C گرمخانه‌گذاری شدند و رشد باکتری هر 30 دقیقه از طریق شمارش در پلیت بررسی شد. مقاومت به اسید از طریق مقایسه تعداد نهایی باکتریها با زمان صفر تعیین گردید. نتایج نشان‌داد که لاکتوباسیلوس‌ها به اسید و نمک صفراوی مقاومت مناسبی را نشان می‌دهند و دارای توانایی مناسبی در دکانژوکه کردن نمک صفراوی هستند. البته از لحاظ توانای دکانژوکه کردن و مقاومت به نمک-های صفراوی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر ندارند ولی لاکتوباسیلوس رئوتری(DSM 20016) مقاومت بالاتری نسبت به اسید نسبت به دو باکتری دیگر از خود نشان داد. با توجه به اینکه لاکتوباسیلوس رئوتری(DSM 20016) توانای زنده ماندن و رشد در دستگاه گوارش بیشتری دارد می‌تواند به عنوان پروبیوتیک موثر در کاهش کلسترول خون درنظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: دکانژوکه کردن، نمک صفراوی، مقاومت به نمک، مقاومت به اسید، کلسترول

Study of Acid and Bile Tolerance and Bile Salt Deconjugation Ability of Lactobacilli

Nourbakhsh H.[1*, **], Bitaraf M.[1]., Khodaiyan F.[2]

1; MSc Student, Dept of Food Science and Engineering of Tehran University

2; Assistant Professor, Dept of Food Science and Engineering of Tehran University

hnourbakhsh@ut.ac.ir, monabitaraf@ut.ac.ir, khodaiyan@ut.ac.ir

Introduction: increased serum cholesterol correlates highly with the incidence of coronary heart disease. Many studies have reported that probiotics are able to reduce cholesterol in the presence of bile salts and via deconjugation of them. In this study, acid and bile tolerance and bile salt deconjugation ability (effective factors in cholesterol reduction) of Lactobacillus reuteri (DSM 20016), Lactobacillus acidophilus (DSM 20079) and Lactobacillus casei (DSM 20011) were investigated.

Methods: Sterile filter disks were inoculated with active culture (20µl) and placed on MRS agar plates supplemented with 0.5% sodium Taurocholate. Plates were incubated anaerobically at 37°C for 72h. Subsequently, diameter of the halo around disk was measured as a qualitative indicator of deconjugation ability.

In order to study the bile tolerance, MRS broth supplemented with 0.3% oxgall inoculated with 10% fresh culture and incubated at 37°C. Bacterial growth was monitored hourly by measuring absorbance at 620nm.

Acid tolerance was studied by incubating the organisms in MRS broth at pH 2.0. Culture was incubated at 37°C for 2h, and growth was monitored every 30 minutes using the plate count method. Acid tolerance was determined by comparing the final plate count with the initial plate count at 0h.

Results: The results showed that Lactobacilluses are bile and acid tolerant and has the ability to deconjugation of bile salts. Although are not considerable differences between bacteria in terms of deconjugation ability and resistance to bile salts, But Lactobacillus reuteri (DSM 20016) showed that has higher acid tolerant rather than other bacteria.

Conclusion: Therefore, Lactobacillus reuteri (DSM 20016) is higher ability to survive and grow in the intestinal tract and considered as an effective probiotic for reducing of blood cholesterol.

Key words**:** Deconjugation, bile salt, Bile Tolerance, Acid tolerance cholesterol

شناسه: OH8

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر علیه چهارباکتری پاتوژن روده ای

کریمی نیک اشرف*، امینی جاوید، حبیب الهی محمدحسین

دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان، گروه میکروبیولوژی، عضو هیات علمی ، akarimish@yahoo.com

امروزه عوامل شیمی درمانی ضد میکروبی بطور وسیعی جهت کنترل عفونت های سیستم گوارشی بکار گرفته می‌شوند ولیکن در حال حاضر مصرف گسترده آنتی بیوتیک ها بدلایل پیدایش سوش های مقاوم به دارو و اثرات جانبی و توکسیسیته مزمن آن‌ها چندان مورد رضایت نیست. باکتری‌های پروبیوتیک از قبیل لاکتو باسیلوس‌ها، دارای اثرات ضد میکروبی بر ضد باکتری‌های پاتوژن روده‌ای می‌باشند. این باکتری‌ها نقش خود را از طریق تولید اسیدهای آلی، پر اکسید هیدروژن، باکتریوسین و ممانعت از اتصال باکتری‌های پاتوژن به مخاط روده اعمال می نمایند. روش کار: در این مطالعه چهار گونه مختلف لاکتوباسیلوس شامل لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (PTCC 1332)، لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC 1608)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم(PTCC 1058) و لاکتوباسیلوس فرمنتوم (PTCC 1638) جهت بررسی فعالیت بازدارندگی آنها نسبت به چهار باکتری ایکولای ، استافیلوکک اورئوس، شیگلا دیسانتریه و سالمونلا پاراتیفی مورد آزمایش قرار گرفتند. در روش اول لاکتوباسیلوس ها بطور جداگانه روی محیط ام.ار.اس، بصورت نقطه‌ای تلقیح و بمدت 48 ساعت در دمای 37 ℃ قرار داده شدند. بعد از تشکیل کلنی‌ها هر پلیت با 7 سی سی محیط کشت ترپیتیکاز سوی آگار نیمه جامد (0/75 درصد آگار) تلقیح شده با 0/1 میلی لیتر از سوسپانسیون کشت میکروبی 24 ساعت با هر یک از باکتری‌های شاخص پوشانده شد. این عمل در مورد هر لاکتوباسیلوس و باکتری‌های مورد آزمایش بطور جداگانه انجام شد. پلیت ها بمدت 24 ساعت در 37c انکوبه شدند و فعالیت ضد میکروبی آنها با اندازه گیری قطر هاله ممانعت از رشد بررسی گردید در روش دوم از سوپرناتانت سوسپانسیون کشت 48 ساعته از هر لاکتو با سیلوس در محیط ام.ار.اس، مایع غلظت های مختلف 2، 5/5 و10درصد از آن ها تهیه گردید و به روش ایجاد چاهک روی محیط کشت BHIA تلقیح شده و با هر باکتری پاتوژن مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین pH اسیدی سوسپانسیون توسط هیدروکسید سدیم تا 7 تنظیم گردید و مجددا

آزمایشات تکرار گردیدند. نتیجه: مشخص گردید که رشد انتروپاتوژن‌ها در حضور کلیه لاکتوباسیلوس ها متوقف شد و هاله های عدم رشد بین 20 تا 30 میلی متر مشاهده گردید. هر دو روش نتایج رضایت بخشی را نشان دادند یافته ها مشخص نمود که pH اسیدی هیچ تاثیری بر توانایی فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس ها ندارد. بحث و تحقیق: اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها بایستی در شرایط درون تنی و درمان بیماری‌ها مورد ارزیابی قرار گیرند و تحقیقات گسترده‌تر و تکنولوژی نوین در جهت تهیه فراورده‌های مهم از پروبیوتیک ها صورت پذیرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک ، انتروپاتوژن ، اثرات ضد میکروبی

The study on antimicrobial activity of probiotic bacteria against 4 enteropathongens.

Kariminik A* ,Amini J ,Habibollahi M.H.

Academic member of university,akarimish@yahoo.com

Islamic Azad university, kerman branch, Dept of Microbiology.

Introduction: Antimicrobial chemotherapeutic agents have been widely used to control gastrointestinal infections, However,the widespread use of antibiotics is now being discouraged due to problems including the emergence of drug-resistant strains and chronic toxicity. probiotic bacteria such as lactobacilli have antimicrobial effects against enteropthogens through producing organic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins and inhibiting the cell adhesion of pathogenic organisms. Material and Method: In this study ,4 species of lactobacillus: *L. bulgaricus (PTCC 1332), L. casei (PTCC1608), L.plantarum (PTCC 1058)* and *L.fermentom (PTCC1638)* were tested for inhibitory effects on indicator pathogens: *E.coli, S.aureus, Salmonella paratyphi A* and *Shigella dysantriae* by agar overlay method. Lactobacillus species were spot – inoculated onto the MRS agar and incubated at 37 C for 48h. After the formation of colonies ,these plates were overlaid with 7ml of soft (0.75% agor) Tripticase Soy agar containing 0.1ml of suspension of each enteric pathogens.These plates were incubated at 37 C for 24 h.The antimicrobial activity of each lactobacillus was assessed by measuring zone of inhibition. Also the antimicrobial activity of the lactobacillus culture supernatant was tested by agar well diffusion method on BHIA media. The pH of each suspension was adjusted to 7.0 by the addition of NaoH and the experiments was repeated. Results: The results of this study showed that growth enterpathogens were inhibited by the presence of Lactobacillus and the antimicrobial mechanism of the lactobacilli, was not due to acidity. Discussion: Antimicrobial effects of lactobacillus should be evaluated further for the treatment and prevevtion of disease *in vivo*.The future scientific and technological research trends will be to develop technology for novel or artificial probiotics.

Key words: probiotic, Enteropathogen, Antimicrobial effects.

شناسه: OH9

بررسی خصوصیات محصولات ضد میکروبی تولید شده توسط باکتریهای لاکتیک جدا شده از ماستهای محلی

کیائی الهه[**] ، آنییا آهنی آذری[2]

1–کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، عضو استعدادهای درخشان باشگاه پژوهشگران جوان

2– عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگانelahe_kiaei81@yahoo.com

پروبیوتیکها مکملهای غذایی میکروبی هستند که با بهبود تعادل میکروبی روده تاثیرات سودمندی برروی سلامت انسان دارند. باکتریهای لاکتیک نقش مهمی در تولید و نگهداری مواد غذایی تخمیری و تهیه محصولات پروبیوتیکی ایفا می‌کنند .هدف از این تحقیق بررسی ماهیت محصولات ضد میکروبی تولید شده توسط باکتریهای لاکتیک جدا شده از ماستهای محلی استان گلستان موثر بر باکتریهای پاتوژن بود. 35 نمونه ماست محلی از شهرهای مختلف استان جمع‌آوری شده و باکتریهای لاکتیک موجود در آنها با استفاده از محیطهای کشت MRS و M17 جداسازی و با تستهای بیوشیمیایی شناسایی گردیدند. قابلیت ممانعت کنندگی از رشد آنها به روش انتشار در آگار بر علیه 7 گونه باکتری گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. ماهیت ترکیبات ضد میکروبی گونه‌های موثر توسط آنزیم‌های کاتالاز، پروتئاز ، تریپسین ، بررسی مقاومت دمایی و تغییرات pH بررسی گردید. از نمونه‌های ماست جمع‌آوری شده 15 گونه *لاکتوباسیلوس* و 8 گونه *استرپتوکوک* جدا شد. ترکیبات ضد میکروبی از رشد *یرسینیا انتروکولیتیکا* ، *سالمونلا تیفی* ، *استافیلوکوکوس اورئوس و شیگلا دیسانتری* جلوگیری نمودند. از بین گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس دلبروکی* ، لاکتوباسیلوس *برویس* و *لاکتوکوکوس رافینولاکتیس* بیشترین تاثیر را داشتند. *لاکتوباسیل‌های* موجود در استارترهای ماستهای محلی استان گلستان نسبت به *لاکتوکوکوس‌ها* در مقابله با پاتوژنها توانائی بیشتری از خود نشان دادند. از خصوصیات این ترکیبات مقاومت در برابر گرما 120 درجه سانتیگراد به مدت 80 دقیقه وهمچنین حفظ فعالیت در pH

قلیایی می‌باشد. همچنین فعالیت ضد میکروبی آنها پس از مجاورت با پروتئاز و تریپسین به طور کامل از بین رفت در صورتی‌که کاتالاز هیچ تاثیری روی فعالیت آنها نداشت.

کلمات کلیدی: باکتریهای اسید لاکتیک، ویژگی محصولات ضد میکروبی، ماست.

Evaluation of antimicrobial products properties produced by lactic acid bacteria

Isolated from homemade youghurts

Kiaei E.[**],Ahani A.[2]

Islamic Azad University of Gorgan,member of Young Researcher Club

2. Islamic Azad University of Gorgan elahe_kiaei81@yahoo.com

Probiotics have been defined as live microorganisms that confer a health effect on the host when consumed in adequate amounts. Lactic acid bacteria play an important role in production and preservation of fermented foods and preparation of probiotic products. The purpose of this study is to detect produced antimicrobial products by lactic acid bacteria

isolated from homemade youghurtseffective on pathogenic bacteria. 35 yoghurt samples were collected from different towns and Lactic acid bacteria present in this samples isolated with MRS agar and M17 agar and identified by diferent biochemical tests. Antimicrobial effects were performed by Disc diffusion method against 7 species of Gram-positive and Gram negative bacteria. Antimicrobial products were determined after treatment with protease , trypsin and catalase and heat stability and activity in differnt pH values.In this study we isolated 15 species of *Lactobacillus* and 8 species of *Lactococcus*. These antimicrobial products had broad inhibitory effects on pathogenic bacteria such as *Y. enterocolitica, Sal. typhi, S. aureus and Sh. dysentria*. *Lactobacillus delbrucii* , *Lactobacillus brevis* and *Lactococcus rafinolactis* showed better effects than other strains. *Lactobacillus* strains that present in home made yoghurts showed better effects than

Lactococcus . Characterization studies revealed that these products are stable in 120°C for 80min and active at alkaline pH values. Their inhibitory activity was completely destroyed after treatment with protease and trypsin while catalase had no effect on their activity.

Key Words: Lactic acid bacteria, Antimicrobial products properties , youghurt

شناسه: PH10

بررسی اثر آنتاگونیستی سه نوع پروبیوتیک(لاکتوباسیلوس) بر روی *Escherichia.coli* های عامل عفونت ادرای

عطیه نادری

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ایی اند که وقتی توسط میزبان مصرف می شوند، در سلامتی میزبان دارای اثرات مفیدی می باشند. امروزه استفاده از پروبیوتیک ها به منظور پیشگیری و درمان بیماری ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیل ها به عنوان ارگانیسم های پروبیوتیکی بر علیه *Escherichia.coli* عامل عفونت ادراری، می باشد.حدود 200 نمونه‌ی ادراری جمع‌آوری و با دو طریق،کشت بر روی محیط افتراقی کروم آگار و روش سنتی کشت بر روی مکانکی و بلاد آگار به همراه تست های بیوشیمیایی تأییدی، بررسی شدند.100 نمونه از لحاظ عفونت ادراری مثبت بودند و باکتری های آن نیز جداسازی و شناسایی شدند. از بین باکتری های جدا شده *Escherichia.coli* بیشترین تعداد (44٪) را به خود اختصاص داد. با روش کربی- بوئر، میزان حساسیت آنها نسبت به 11 آنتی بیوتیک رایج در درمان عفونت ادراری بررسی شد. سپس سویه‌های با مقاومت چند گانه غربالگری گردید و اثر ضد میکروبی سه گونه لاکتوباسیلوس، شامل: ل.کازئی(ATCC 39392)، ل.رامنوسوس(ATCC 7469)، ل.اسیدوفیلوس (ATCC 4356)، به روش agar well diffusion و تعیین MIC با روش سری رقت با میکروتیترپلیت، بر روی آنها بررسی گردید. همچنین میزان MIC سویه ها قبل و بعد از اثر پروبیوتیک ها بر روی آنها، نسبت به 3 آنتی بیوتیک آمپی سیلین، سیپروفلوکساسین و کوتریماکسازول از داروهای انتخاب اول در درمان عفونت ادراری، به منظور بررسی سینرژیسم پروبیوتیک ها با آنتی بیوتیک ها در سویه های مزبور، تعیین گردید.

نتایج نشان دادند که سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازئی بیشترین اثر مهاری را بر روی*Escherichia.coli* های با مقاومت چندگانه (8 گانه و 9 گانه) به آنتی بیوتیک ها، داشته است. . میزان MIC سویه ها قبل و بعد از اثر پروبیوتیک ها نسبت به سه آنتی بیوتیک ذکر شده در بالا، یکسان بود، در نتیجه می‌توان بیان کرد که لاکتوباسیلوس های به کار رفته، قادر به ایجاد تغییر در الگوی مقاومت سویه های مورد مطالعه نبودند. ارتباط مثبتی بین میزان pH در اثر تولید اسید های آلی و فعالیت آنتی باکتریال پروبیوتیک های مزبور وجود د اشت. همچنین با بکارگیری پروتئیناز k، مشخص شد که به احتمال زیاد در سوپرناتانت به‌کار رفته، باکتریوسین نبوده است.با توجه به تعاریف و کاربرد های محصولات پروبیوتیک در پیشگیری و درمان بیماری ها، می‌توان از آن به عنوان فراورده های با ارزش نام برد.همچنین با توجه به مطالعه حاضر، ل.کازئی اثر مهاری چشمگیری داشت. میتوان از لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان یک کاندید احتمالی به عنوان یک پروبیوتیک بر علیه *Escherichia.coli* عامل عفونت ادراری، استفاده کرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، عفونت ادراری، لاکتوباسیلوس ، *Escherichia.coli*.

The Study of Antagonistic Effect of Three Probiotics from lactobacillus on uropathogenic *Ecoli.*

Introduction: probiotics are alive microorganisms that have beneficial effects on the host health. Today, the use of probiotics to prevent and treat diseases has been considered very much. The aim of this study is to analyse *Lactobacilli* antagonistic activity as probiotic against uropathogenic *E.coli.*

Material and Methods: About 200 collected urine samples were considered by two different ways: culturing on differential medium, CHROM agar and also culturing on Mac Conkey and blood agar with confirmatory biochemical tests. 100 samples exhibited UTI. Among the identified isolates, *Escherichia.coli* was the most prevalent uropathogen (44%). Sensitivity to eleven common antibiotics used for the treatment of these infections were evaluated by Kerby-Boyer method. Subsequently, strains with multiple resistance were screened and the anti-bacterial effects of three species of *Lactobacilli* were tested using agar well diffusion. In addition, MIC was determined with serial dilutions on microtiter plates. Also, the MIC of strains before and after probiotics effect on them toward three antibiotics Ampicillin, **Ciprofeloxacin** and Co-trimoxazole as the first choice drugs in the treatment of UTI, in order to study synergistic interplay between probiotics and antibiotics, were determined.

Results: The results showed that the supernatant of *L.casei* have significant inhibitory effect on MDR strains. MIC rate of strains before and after probiotics effect toward mentioned antibiotics, was the same that showed the applied *Lactobacilli* isolates were unable to change the resistance pattern strains**.** A direct relationship was detected between pH values in response to acid production and the antibacterial activities of the probiotics used. Also, by using K proteinas, it was found that probably there was no bacteriocin in supernatant.

Discussion: To the definitions and applications of probiotic products in the prevention and treatment of diseases, it can be as valuable products. Also in this study, the highest inhibitory effect was related to *L.casei.* therefore ,probably *L.casei* as probiotic can be a good candidate against uropathogenic *Ecoli.*

Key words**:** probiotics, uti, Lactobacilli, Escherichia.coli **.**

شناسه: OH11

کاهش اثرات سمی افلاتوکسین موجود در جیره غذایی طیور با استفاده از پروبیوتیک

لاری‌پور محدثه* **، اخوان‌سپهی عباس

**دانشجوی دکتری تخصصی، گروه قارچ‌شناسی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران

استادیار، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

هدف: بررسی میزان مهار اثرات مخرب افلاتوکسین با استفاده از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بعنوان پروبیوتیک در جیره طیور

پروبیوتیک، محصولی حاوی میکروارگانیسم های زنده و مشخص است که نه تنها فلور میکروبی را از طریق مستقر شدن در بخشی از بدن میزبان تغییر می دهد، بلکه با باند شدن با سموم ، باعث اعمال اثرات مفید بر سلامت میزبان می شود.عواملی چون اشعه درمانی،استرس شدید در دوران بارداری،حساسیت های ژنتیکی، مصرف غذاهای حاوی توکسین های قارچی ،توازن فلور میکروبی روده را برهم می زنند و باعث غالبیت باکتری های مضر در روده می شود و عوارض خطرناکی برای حیوان و انسان ایجاد می کند. قارچ هایی مثل آسپرژیلوس ، فوزاریوم و پنی سلیوم در تولید مایکوتوکسین های مضر از جمله افلاتوکسین ها مهم هستند .
آفلاتوکسین ها،متابولیت های سمی و سرطانزای قارچی می باشند.این سموم با آلوده نمودن بسیاری از محصولات مهم غذایی از راه های مختلف، قادربه ایجاد مشکلات غیرقابل جبرانی برای انسان وحیوان می شوند. . از اثرات نامطلوب آن بر بدن می توان به کاهش وزن واختلال درعملکرد کبد اشاره نمود که در حیوانات با افزایش ضریب تبدیل غذا ،کاهش رشد، کاهش میزان تخم گذاری و کاهش میزان شیر وغیره همراه است. با توجه به هزینه اجرای برنامه های کنترلی مربوط به سموم قارچی، هزینه های عمومی کلانی را بر جامعه تحمیل می شود.پروبیوتیک تراپی در طب دامی نیز همانند طب انسانی بطور روز افزونی در حال گسترش است و استفاده از آنها در درمان و پیشگیری از ضررهای جانی واقتصادی دردامپزشکی،مهم است. افلاتوکسین از شرکت سیگما وسویه پروبیوتیک از سازمان پزوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه شد. (بیفیدوباکتریوم بیفیدوم سویه PTCC 1644) .دو گروه جوجه با سن 3 هفته و هر گروه شامل 36 قطعه با روش نمونه گیری تصادفی در یک مرغداری انتخاب شد، گروه تیمارهمراه با جیره غذایی پروبیوتیک(ML 5×1010 CFU/ 50PBS) را روزانه و به مدت 6 روز و گروه کنترل فقط PBS را به همراه جیره غذایی روزانه دریافت کردند.
بلافاصله بعد از روز چهارم به تمام جوجه ها یک دوز خوراکی AFB1 (5/1kg/ µ MOL در4/8دی متیل سولفوکساید) داده شد و مدفوع آنها تا 3 روز پس از دوز AFB1 جمع آوری و میزان آفلاتوکسین دفعی در دو گروه با هم مقایسه شده و در پایان 6 روز نیز بار دیگر توسط HPLCمیزان آفلاتوکسین B1 دفعی دو گروه اندازه گیری شد.علاوه بر اینها وزن جوجه ها(در شروع مطالعه، در دوز آفلا

توکسین و در پایان مطالعه) ضریب تبدیل غذایی و میزان تلفات در هر دو گروه تعیین و ثبت گردد.داده ها پس از جمع آوری و ثبت در پرسشنامه توسط نرم افزار اماری SPSS و ازمون آماری T-TEST تجزیه وتحلیل شد.

افزودن پروبیوتیک تاثیر معنی داری بر کاهش میزان افلاتوکسین دستگاه گوارش ،افزایش ان در مدفوع و کاهش ضریب تبدیل غذایی دارد. با اندازه گیری میزان افلاتوکسین درمدفوع هر دو گروه شاهد وکنترل، با روش HPLC،تفاوت معنی داری بین دوگروه شاهد وتیمارمشاهده شد. ($P<0/001$) همچنین تاثیر پروبیوتیک بربهبود وکاهش ضریب تبدیل غذایی از لحاظ آماری معنی دار بود،($P<0/01$) استفاده از پروبیوتیک با باند شدن با افلاتوکسین باعث کاهش مصرف دان وافزایش وزن بدن وکاهش میزان تلفات گله شد.درنتیجه از پروبیوتیکها میتوان به عنوان یک افزودنی بجای آنتی بیوتیکها در تغذیه طیور استفاده کرد. بطوریکه در هنگام استفاده از پروبیوتیکها از میزان سمیت افلاتوکسین کاسته می شود.

گل واژگان:پروبیوتیک-بیفیدوباکتریوم بیفیدوم-افلاتوکسین-جیره غذایی طیور

Reduce toxic effects of aflatoxin in poultry feed with used to probiotic

Larypoor M (student of Ph.D.),Akhavansepahy A.(Ph.D.)**

** Department of veterinary Mycology, Faculty of veterinary,Science and research branch Azad Islamic university,Tehran, Iran

Department of Microbiology, North Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran

Objective: Evaluation of reduce of the toxic effects of aflatoxin using *Bifidobacteri bifidom* as probiotic in poultry feed. Probiotic, is products containing live microorganisms ,that not only change microbial flora through of the host body, but also bind with toxins, and have the useful effects on health the host. Factors such as radiation therapy, stress during pregnancy, genetic susceptibility, consumption of foods containing fungal toxin, disrupt the intestinal microbial flora balance and dominant harmful bacteria in the intestine and can be dangerous for domesticated animals and humans . Fungi such as *Aspergillus, Fusarium* and *Penicillium* product mycotoxin such as aflatoxin .The most of Aflatoxin, is Aflatoxin –B1.This toxin is the fungal metabolites that have toxic and carcinogenic properties. So Aflatoxin –B1 contaminate most important food and feed products through various unreparative effects and create unacceptable problems for humans and domesticated animal. . It can decrease weight and disorder in liver function that in animals accompanied by increased feed conversion ratio , decrease growth rate and reduced milk.This toxins notonly reduced agricultural products, but also increase the cost of programs to control fungal toxins and impose the large public costs on community. Probiotic therapy is in medicine as well as, veterinary and is increasingly development .It is important touse in the treatment and prevention of damage economical and medical in different animal species.
Aflatoxin of sigmacompany and probiotic of IROST(*Bifidobacteri bifidom* PTCC 1644) are prepared . Two groups of chickens 3 weeks of age and each group includes 36 pieces with random sampling was selected in a poultry. group treatment with dietary probiotic (ml PBS 50CFU/5×10^{10}) daily and for 6 days and another group (control) with only a PBS daily food rations received. Immediately after the fourth dose all the chickens an oral dose of AFB1 (1.5µmol/kg body weight in4.8 DMSO ml) were given and collected feces 3 days after the dose of aflatoxin -B1 and the excretion binding AFB1 rate compared in the two groups and in the end of 6 days were measured Aflatoxin B1 excretion rate by HPLC in two groups again. In addition chickens weight (the beginning of the study, after reciving the dose of aflatoxin -B1 and the end

of the study) feed conversion ratio and mortality rate in both group is determined and recorded. Data collection and registration of the questionnaire was analyzed statistical software spss statistical testandt-test..
Adding probiotic have significant effect on reducing aflatoxin GI tract, increasing the excretion binding AFB1 rateand reduced the feed conversion ratio. Aflatoxin measure in excretion of both groups to method of HPLC.Significant difference was seen between the control and treatment group . ($P < 0/001$) So the probiotic effect on reduce feed conversion ratio was statistically significant. ($P < 0/01$) This matter show that probiotic binding aflatoxin inhibitate hurmful effects of aflatoxin in decrease growth . Thus, the probiotic can be as an additive instead of antibiotics used in poultry nutrition. So that when using a probiotic , reduce the amount of aflatoxin toxicity.
Keywords:: probiotic - *Bifidobacteri bifidom* - aflatoxin - feeding poultry

شناسه: OH12

عنوان : بررسی ویژگی های شیمیایی وحسی ماست قالبی پروبیوتیکی باکاربرد کشت های آغازگر مخلوطی ABY2

مشفق، مرجان نظامی، محمد امین***

** (مسوول تحقیق و توسعه شرکت صنایع شیر پگاه- کارشناس صنایع غذایی)

*(تحقیق و توسعه شرکت صنایع شیر پگاه- کارشناس ارشد صنایع غذایی)

دراین مطالعه کشت های مخلوطی پروبیوتیکی ABY2(بیفیدوباکتریوم.بیفیدوم (BB12)، لاکتوباسیلوس.اسیدوفیلوس(LA5)، ال..بولگاریکوس اس. ترموفیلوس)(DVS-Ch Hansen Denmark) برای تولید 2 نوع ماست قالبی کم چرب وپرچرب درشرایط آزمایشگاهی استفاده شد. شیر مورداستفاده اولیه پس ازاستاندارد شدن درصد چربی وماده خشک بی چربی درآزمایشگاه با دستگاه هوموژنیزاتور (Niro Soavi GEA Italy) با فشار 180 بار و دمای 65 درجه هوموژن شده و در حمام آب داغ (Funke Gerber Germany) پاستوریزاسیون در دمای 95 درجه سانتی گراد 5 دقیقه صورت گرفت در دمای 43 درجه میزان 2/5 درصد (w/v) کشت ABY2 (50U) به ماست ها تزریق گردید و در گرمخانه تا رسیدن اسیدیته 74 درجه دورنیک و(pH=4.56) حدود 4ساعت نگهداری شدند سپس ماست های کم چرب وپرچرب به سردخانه 5 درجه سانتی گراد انتقال داده شدند، نتایج آزمون شیمیایی سردخانه 24 ساعته ماست کم چرب2/5 درصدچربی دارای اسیدیته 90 درجه دورنیک (pH=4.32)و ماست پرچرب 4/25 درصدچربی دارای اسیدیته 93 درجه دورنیک و (pH=4.3) بودند که بیانگر اسیدسازی ثانویه آغازگرهای پروبیوتیک و آغازگرهای گرمادوست ماست بود که بیشتر به آغازگر ماست ال. بولگاریکوس واس. ترموفیلوس می توان نسبت داد و توسعه اسیدیته بیشتر از ماست های شاهد مشاهده شدکه به خواص همیاری رشد پروبیوتیک ها درکنار آغازگرهای ماست می توان نسبت داد. بررسی ویژگی های حسی (رنگ، عطروطعم، انسجام بافت وآب انداختن)توسط ارزیابان حسی نشان داد که ماست های کم چرب و پرچرب بادارابودن ویژگی عطروطعم ضعیفتراز ماست شاهد پروبیوتیکها در تولید عوامل عطروطعم (استالدییدی و...) ضعیفتر از آغازگرهای گرمادوست ماست هستند ولی آزمون های بافت نشان دادند که ماست های پروبیوتیکی کم چرب وپرچرب بافت باقوام بیشتری داشتند .در بخش تولید صنعتی ماست کم چرب 1/45 درصد با گرمخانه گذاری 3/25 ساعت دمای 43درجه ورسیدن به اسیدیته 70 درجه دورنیک (pH=4.45)پس از 24 ساعت دارای اسیدیته 108 درجه دورنیک و(pH=4.02) بود که نتایج اسیدسازی ثانویه تولید همانند بخش آزمایشگاهی مشاهده شد و ماست ها در 2شرایط دمای محیط 20 درجه و 5 درجه 20روزه بررسی شدند. ماست های سردخانه ای اسیدیته 120 درجه دورنیک و(pH=3.85) داشتند که با شرایط رشدوبقای پروبیوتیک ها تاحدی مغایرت داشتند و در دمای محیط 20 درجه (همانند شرایط نگهداری بیرون از یخچال در فروشگاه ها و مغازه ها)اسیدیته 187 درجه

دورنیک و(pH=3.55) را نشان دادند و این نوع ماست ها بهتر است در دمای 5درجه نگهداری شود وپیشنهاد می شود که از گونه های آغازگر با تولیداسید ثانویه کم در کنار آغازگرهای پروبیوتیکی به صورت ضمیمه ای به کارگرفته شود تا رهیافت های خوب و شرایط اسیدسازی کنترل شده در حدایدآل پروبیوتیک ها در دمای نگهداری سرد و دمای محیط حاصل گردد.

کلیدواژه : پروبیوتیک ضمیمه ای، ماست قالبی ، اسیدسازی ثانویه

Research on the Chemical and Sensory Evaluation of Probiotic Set Yoghurt Using Starter Culture ABY2

In this study we have used the starter culture ABY2 (Bifidobacterium. Bifidum (BB12),Lactobacillus.acidophilus(LA5),Lactobacillus.bulgaricus ,streptococcus.thermophilus), (DVS-Ch Hansen ,Denmark) for the production of 2 kinds of Set yoghurt (Low fat, Full fat) in laboratory scale. Primarily Milk after standardization of the (Fat) and (Solid not fat) Homogenized at 180 bar and 65(*C)by using Homogenizator (Niro Soavi GEA, Italy) and then Pasteurized using Pasteurizator (Funke Gerber, Germany) at 95(*C) during 5 minutes then Cooled up to 43(*C) and inoculated 2.5 % (v/v) the starter culture ABY2, finally have evaluated during Incubation 43(*C) up to reaching the Acidity approximately 74(*D) and pH=4.56 for 4 hours and then stored at cool place at 5(*C). The results of the chemical analysis after 24 hours of cool storage 5(*C) of the low fat(2.5 % Fat) probiotic set yoghurt have shown the Acidity approximately 90 *D and pH=4.32 as well as for Full fat (4.25% fat) set yoghurt with the Acidity 93 (*D) and pH=4.3 which have shown the Post acidification of probiotic in the presence of thermophilic yoghurt starter cultures that was more appears to be because of Yoghurt Starter cultures which expressed Symbiotic effect of Probiotics in the presence of yoghurt starter cultures. The results of sensory evaluation (colour, flavour, texture and synersis)of probiotic yogurts represented that they were weaker to production of Flavour agents(Acetaldehyde and so on)in comparison to the control yoghurt but The Results of Texture analysis of yoghurts have shown that probiotic set yoghurt (low fat and full fat) were have produced stronger texture than control yoghurts.in part of pilot scale production of low fat (1.45 % fat) Probiotic set yoghurt after 3.25 hours Incubation in 43(*C) and they have

Reached to the Acidity 70(*D) and pH=4.45 and after 24 hours cool storage in 5(*C) led to Acidity 108 (*D) and pH=4.02 that showed unsuitable situation for the survivality and growth of probiotics in presence of yoghurt starter cultures which results of post acidification were the same as the results in laboratory scale and the results of post acidification of 2 kinds storage temperatures (ambient temperature 20 (*C) and cool storage 5 (*C) have evaluated after 20 days at the end of shelf life storage , probiotic yoghurts in cool storage have showed the Acidity 120 (*D) and pH=3.85 as well as this, yoghurts at ambient temperature 20(*C) had Acidity 187 (*C) and pH=3.55 which represented that those yoghurts in ambient temperature like shops and stores outside of refrigerator became sour yoghurts which supposed to keep in cool place to avoiding more post acidification as well as suggested to use of some species of thermophilic yoghurt starter culture with low post acidification effect in the presence of probiotic as adjunct starter cultures to find good approaches to monitor acidification of the thermophilic starter culture for the optimal growth and survivality of probiotics in yoghurt substrates for the storage in cool place and ambient temperatures.

Keywords: adjunct probiotics, Set yoghurt , Post acidification

شناسه:OH13

جداسازی سویه های بومی بیفیدوباکتریوم با استفاده از روش کلاسیک وPCR

مژگان حیدرپور1*– دکتر سعید میر دامادی[2]–فهمیدخت مختاری[3]m.heidarpor@yahoo.com

سازمان استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران پژوهشکده غذایی کشاورزی

سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران

سازمان استاندارد وتحقیقات صنعتی ایران پژوهشکده غذایی کشاورزی

بیفیدوباکتریوم‌ها از مهمترین گونه‌های پروبیوتیکی شناخته شده هستند و امروزه تلاش‌های وسیعی در جهت جداسازی این باکتریها از منابع مختلف جهت استفاده از آنها در محصولات غذایی در حال انجام است، هدف از این مطالعه جداسازی سویه های بومی بیفیدوباکتریوم‌ها از محصولات لبنی بومی بود.در این تحقیق با استفاده از محیط های کشت اختصاصی، آزمون انحصاری فروکتوز 6 فسفات فسفوکتولاز و مقاومت به میوپیروسین ما قادر به جداسازی 37 ایزوله باکتریایی به عنوان بیفیدوباکتریوم از محصولات لبنی بومی شدیم .به علاوه در این تحقیق به طور هم زمان با استفاده از تکنیک PCR و تکثیر نواحی از ژن 16SrDNA و با استفاده از پرایمرهای Bif164,Bif662وLm3,Lm26 به طول 523 و 1350 جفت باز به تایید باکتریهای جداشده پرداختیم. در نهایت محصول PCR قطعه523 جفت بازی، پس از خالص‌سازی تعیین توالی گردید و با استفاده از برنامه های نرم افزاری مناسب به مقایسه این توالی، با توالی های بانک ژن و یگدیگر پرداختیم.توالی محصولات PCR با قسمتی از ژن 16SrDNA بیفیدوباکتریوم هم خوانی بالایی داشت و لذا اختصاصی بودن محصولات PCR تایید شد. و در نهایت 6 زن جدید با نام های,EU7464405 ,EU594328,EU594329, EU7446408, EU7464407 در بانک ژن به ثبت رسید و ثبت سویه ها فوق در کلکسیون میکروبی ایران در حال انجام است . به نظر می رسد که باکتریهای ایزوله شده ا انتخاب های مناسبی برای استفاده در صنایع لبنی می باشند

کلمات کلیدی: بیفیدوباکتریوم – فروکتوز6 فسفات فسفوکتولاز – میوپیروسین– PCR

Isolation Bifidobacterium from traditional dairy products method by clacical and PCR

Mojgan Heidarpour_ Mirdamadi saeed_fahmdokt moktari

1-Institute of Standards and Industrial Researches of Iran (ISIRI),

2-Iranian Research Organization of Science and Technology (IROST)

Bifidobacteria are considered as one of the most important and recognized probiotic species, and nowadays wide attempts are being made to isolate these bacteria from different sources for the purpose of using them in foodstuffs.

The aim of this study was to isolate Bifidobacterium from indigenous dairy products.

In this research which was performed simultaneously on 120 indigenous dairy products, and negative and positive , by the use of specific media, exclusive test of fructose-6-phosphate phosphoketolase and resistance to muprocin, we were able to isolate 37 bacterial isolates as Bifidobacterium from indigenous dairy products.

In addition, in this research we verified the isolated bacteria simultaneously by the use of PCR technique and amplification of regions of 16S rDNA gene assay using Bif164/Bif662and Lm3,Lm26primers by the length of 523 and 1350 base pairs

Finally, the sequence of the PCR product of the fragment with 523 base pairs was determined after purification, and by making use of appropriate softwares, we compared these sequences with each other and with the sequences of gene bank.and 6 gensby name EU7464407,EU7446408, EU594329,EU594328 ,EU7464405,submitted in ncbi T.he sequence of PCR products had great compatibility with a part of 16S rDNA gene of Bifidobacterium, hence the specificity of PCR products was confirmed.

Key words: Bifidobacterium, fructose-6-phosphate phosphoketolase, muprocin, sequence, PCR

شناسه:OH14

بررسی اثر لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان یک پروبیوتیک در مهار رشد باکتری های پاتوژن

میردامادی سعید ** ، آقا قزوینی شادی * ، فلاح پور مسعود ، احمدی به آذین**

دانشیار و عضو هیئت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ، 33 Mirdamadi_sa@yahoo.com

پروبیوتیک ها به عنوان یک ارتقاء دهنده سلامتی و یک نگهدارنده طبیعی مورد توجه قرار گرفته اند. این باکتری ها قادرند ترکیبات ضد میکروبی تولید کنند. از جمله این ترکیبات ضد میکروبی می توان به نیسین اشاره کرد که طیف اثر وسیعی علیه پاتوژن ها دارد. در این تحقیق اثر باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* PTCC 1336 در مهار رشد سه باکتری *لیستریا مونوسیتوژنز* PTCC 1301، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1431و *اشریشیا کلی* PTCC 1399 25922 ، در محیط کشت و پنیر به عنوان مدل غذایی مورد بررسی قرار گرفت. میزان تلقیح برای *لاکتوکوکوس لاکتیس* 10^8 الی 10^7 وبرای سوشهای پاتوژن 10^5 بود. نتایج کشت توام *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* نشان داد که تعداد این باکتری قبل از ورود به فاز لگاریتمی رشد بطور کامل به صفر رسید. ازطرفی در کشت توام با *استافیلوکوکوس اورئوس*، تعداد آن به تدریج کاهش یافت و از 4/6 log CFU/mL در لحظه صفر به 1٪ تعداد اولیه بعد از 48 ساعت رشد توام کاهش یافت. در مورد *اشریشیا کلی* تعداد آن در طی کشت توام از 10^5 CFU/mL در لحظه صفر، بیشتر نشد و از طرفی کاهشی هم مشاهده نشد. در واقع *لاکتوکوکوس لاکتیس* یک اثر مهار رشد را در مورد *اشریشیا کلی* داشت. همچنین بررسی‌میزان مهار این باکتریها در پنیر نشان داد که *لیستریا مونوسیتوژنز* حساسترین سوش در مقایسه با دو باکتری دیگر است. میزان آن از 10^5 CFU به ازای هر گرم پنیر به $1/6 \times 10^3$ CFU در روز هفتم و صفر در روز چهاردهم در مقایسه با نمونه شاهد رسید. در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* ، تعداد آن از 10^5 CFU به $8/2 \times 10^4$ در روز چهاردهم و در روز بیست و هشتم به صفر رسید. در مورد *اشریشیاکلی* ابتدا تعداد آن به 10^6 CFU در روز هفتم رسید و به تدریج از هفته دوم کاهش یافت و با یک هفته تاخیر نسبت به دو باکتری دیگر، یعنی در روز 35 تعداد آن به صفر رسید. با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق می توان *لاکتوکوکوس لاکتیس* را به عنوان یک پروبیوتیک که قادر به مهار رشد باکتریهای پاتوژن و مولد فساد است بدون هیچ اثر نامطلوب بر خواص حسی پنیر، معرفی کرد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک ، کشت توام، مهار رشد، باکتری های پاتوژن ، لاکتوکوکوس لاکتیس

Assessing the inhibitory effect of lactococcus lactis as a probiotic bacteia on food-born spoilage and pathogenic bactera

Mirdamadi Saeed, Agha Ghazvini Shadi*, Fallahpour Masoud, Ahmadi Behazin Hoda, Mirdamadi_sa@yahoo.com**

Iranian research organization for Science and Technology, (IROST), 71, Forsat Str., Tehran, ,IRAN

Probiotic bacteria are concerned as a health promoting bacteria and a natural preservation technique. They can also produce bacteriocins. Nisin is a bacteriocin that has been produced by a group of lactic acid bacteria. It has a broad range of inhibitory effect against pathogens. In this study the inhibitory effect of probiotic bacteria, *Lactococcus lactis* ATCC 11454 against *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphilococcus aureus* ATCC 25923 and Escherichia coli ATCC 25922 was investigated both invitro and in cheese as a food model. Pathogenic bacteria were inoculated to reach 10^5 cfu ml-1 and *L.lactis* was introduced to give 10^7 -10^8 cfu ml-1. Result of invitro associated culture of *L.lactis* with *L. monocytogenes* showed a sharp decrease before starting exponential phase and count of it reached zero before the first 8 hour after inuculation.

In the case of *S.aureus*, its count declined gradually from 4.6 log cfu mL-1 at the time of inoculation to 1% of its first count after 48 hours of mixed culture. Counts of *E. coli* was not exceeded 10^5 cfu mL-1 during associated culture and they didn't decrease. Therefore, an inhibiting effect against all the bacteria was observed. However, *L.lactis* has a growth inhibitory effect against *E. coli* and bacteriocidal effect against *L. monocytogenes* and *S.aureus*. In cheese, counts of *L. monocytogenes* decreased to 10^3 CFU g^{-1} after 7 days and then reached zero on day 32. *S.aureus* counts were remained 10^5 CFU g^{-1} after 7days and then reduced to 10^4 CFUg^{-1} and decreased suddenly to zero at third week. Number of *E. coli* increased to 10^6 cfu mL^{-1} in control and cheese with $^{L.lactis}$, then it declined and the counts were zero on day 35. According to these results, *L.lactis* can be introduced as a probiotic bacterium which can inhibit pathogenic and spoilag bacteria without any positive or negative effect on sensory properties of cheese.

Key words: Probiotic, *L. lactis* , inhibition ,cheese, pathogenic bacteria

شناسه: OH15

شناسایی گونه های انتروکوکسی با پتانسیل پروبیوتیکی جدا شده از پنیر سنتی شهرستان کلیبر با استفاده از توالی یابی و برش آنزیمی ژن16 srDNA

اسلامی صولت[1] - حجازی محمد امین[1]- ابراهیمی پور غلامحسین[2]- برزگری ابوالفضل[1]***

1- پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور

2- دانشگاه شهید بهشتی تهران – دانشکدهٔ علوم زیستی

:سویه های انتروکوکسیایی از منابع لبنی به طور وسیعی بوسیلهٔ کیتهای بیوشیمیایی مطالعه نشده اند، بنابراین ممکن است با این روشها بدرستی شناسایی نشوند. در این مطالعه یک روش مبتنی برPCR توسعه دادیم که با هدف قرار دادن ژن16srDNA اجازه شناسایی انتروکوکسی را در سطح جنس و گونه میدهد.یک جفت آغازگر بر اساس منطقهٔ حفاظت شدهٔ توالیهای ژن 16srDNA انتروکوکسی ها طراحی شد. با استفاده از PCR ژنهای 16srDNA شش سویهٔ انتروکوکسی مختلف جدا شده از پنیر سنتی کلیبر به طور انتخابی از DNA ژنومی تکثیر شدند. محصولاتPCRبر روی ژل آگارز 1/5درصد آنالیز و جهت انجام توالی یابی و هضم آنزیمی، با اندونوکلئازهای محدودگرTaqI وMspIخالص شدند.آغازگرهای طراحی شده ژن16srDNAرا در همهٔ سویه ها با موفقیت تکثیر دادند. محصولاتPCR به اندازهٔ تقریبی1500 جفت نوکلئوتید حاصل شدند. نتایج توالی یابی(ناقص) نشان داد که یکی از ایزوله ها بوسیلهٔ مطالعات فنوتیپی به اشتباه به عنوان انتروکوکسی فکالیس شناسایی شده است، از طرفی تفکیک این ایزوله بین انتروکوکسی فیشیوم و انتروکوکسی دورانس بوسیلهٔ توالی یابی میسر نشد. زمانی که قطعات تکثیر یافته بوسیلهٔ آنزیمهایTaqI وMspI برش داده شدند، سه الگوی برشی برای6 سویهٔ انتروکوکسی بدست آمد. همچنین ایزولهٔ به اشتباه شناسایی شده به عنوان انتروکوکسی دورانس شناسایی گردید. در مورد بقیهٔ ایزوله ها نتایج حاصل از سه روش فنوتیپی، توالی یابی و برش قطعات 16srDNAبا هم موافق بودند.برش آنزیمی16srDNA برای تفکیک گونه های نزدیک به هم در مواردی که توالی یابی ژن16srDNAبه صورت ناقص انجام می گیرد، روشی کارآ میباشد.

کلمات کلیدی: توالی یابی- انتروکوکسی- آنزیمهای محدودگر

Identification of Enterococcus species isolated from traditionally produced cheese of kaleybar by sequencing and restriction enzyme digestion of 16s rDNA gene.

Eslami Solat ❊❊1, Hejazi Mohammad Amin1, Ebrahimipour Gholamhossein2, Barzegari Abolfazl*1

1- Faculty of biology Science, Shahid Beheshti University

2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran Northwest and West region (Tabriz)

Background:Enterococcal strains from dairy sources have not been extensively studied using commercial biochemical kits and so they may not been identified correctly. In this study, we developed a PCR-based assay which allows identification of Enterococci at genus and species level by targeting the 16S ribosomal DNAs gene.

Material and methods:A pair of primers was designed according to conserved region of 16s rDNA gene sequences in Enterococcus recorded in database. 16S rDNA genes of 6 Enterococcus strains isolated from traditionally cheese of kaleybar were selectively amplified from purified genomic DNAs using Polymerase chain reaction. PCR products were analysed on 1.5% agarose gel and were purified for sequencing and restriction enzyme digestion using TaqI and MspI endonucleases.

Results: The designed primers allowed successful amplification of 16srDNA gene in all strains. PCR products yielded a product of ~1500 bp in expected size. Based on (partial) sequencing data it was revealed that one of the isolates was misidentified as E.faecalis by phenotypic studies, but its distinction between E.faecium and E.durans remained unclear yet. When amplicons were digested with restriction enzymes MspI and TaqI, three profiles were seen for 6 Enterococcus. Also, the misidentified isolate was determined as E.durans. In other cases three investigations of phenotypical method, sequencing and digestion of 16S rDNA were in consistent.

Conclusion:16S rDNA-RFLP provides an efficient method to discriminate close related species when sequencing of 16S rDNA gene is done partial.

Key words: sequencing- Enterococcus- restriction enzymes

شناسه: OH16

بررسی اثر ضدجهش‌زایی سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات تخمیری از طریق آزمون ایمز

تاج آبادی ابراهیمی، مریم* [1] زند کریمی، مهدی [3]* روحی بیرون، مهدی [4] هاتفی، میترا* [16]

1-دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران- ایران

2-استادیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، تهران- ایران

3-کارشناس میکروبیولوژی

4- کارشناس میکروبیولوژی

در این تحقیق، خصوصیات ضد جهش‌زایی بیست و یک گونه از باکتری‌های لاکتیک که از محصولات تخمیری جدا شده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. بالاترین میزان ممانعت از جهش زایی در سویه پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی با 72 میزان ممانعت از جهش مشاهده گردید.

در ابتدا بیست و یک گونه جدا شده از مجصولات تخمیری مورد آزمون اولیه قرار گرفتند ولی پانزده گونه برتری چشم گیری داشتند، بنابراین بقیه آزمون ها با آن ها ادامه یافت. همچنین از سویه *Salmonella typhimurium* TA100 برای بررسی خواص ضدجهش‌زایی استفاده گردید. این سویه حامل یک جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود می‌باشد. سویه‌های جهش یافته His^- بر روی محیط کشت حاوی حداقل مواد معدنی و گلوکز در حضور ماده شیمیایی جهش‌زای مورد آزمایش کشت داده شدند. به این ترتیب فقط آن دسته از باکتری‌هایی که با جهش برگشتی، His^+ شده‌بودند، قادر به رشد و تشکیل کلنی بودند. وجود ماده ضدجهش (عصاره محیط کشت سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس) در کنار ماده‌جهش‌زا، میزان جهش برگشتی را کاهش داده که با استفاده از فرمول می‌توان درصد ممانعت از جهش را محاسبه کرد. علاوه بر این وجود اختلاف معنی‌دار بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با ماده جهش‌زا، توسط نرم‌افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، تجزیه و تحلیل گردید.

یافته‌های حاصل از آزمون‌های ضدجهش‌زایی در *in vitro* نشان داد که سویه لاکتوباسیلوس کازئی جدا شده از محصولات تخمیری داخلی، دارای ارزش پروبیوتیکی بالایی بوده و در مقایسه با بقیه نمونه ها اثرات ضد جهش‌زایی بیشتری را از خود نشان می‌دهد، به طوری که درصد ممانعت از جهش در مورد این سویه 72٪ گزارش گردید. از سوی دیگر، کمترین میزان ممانعت از جهش یعنی10٪ در لاکتوباسیلوس رامنوزوس مشاهده گردید.

با توجه به این که در مورد سویه پروبیوتیک بومی ایران خواص زیادی همچون مقاومت در برابر اسید و صفرا، تولید باکتریوسین و کاهش کلسترول در طی تحقیقات مختلفی به اثبات رسیده است و از سوی دیگر نتایج بررسی‌های این مقاله، خواص ضد جهش‌زایی بسیار خوب این سویه را در برابر ماده جهش‌زای آزید سدیم نشان می‌دهد، لذا می‌توان نتیجه گرفت که جداسازی و افزودن این سویه می‌تواند خواص پروبیوتیکی ویژه‌ای به مواد غذایی دارای آن بدهد.

کلید واژه: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس کازئی، سالمونلا تیفی‌موریوم، اثر ضدجهش‌زایی، آزمون ایمز

Study of Antimutagenesis Effect of

Different Strains of *Lactobacillus* Derived from Fermented Dairy Products

By Means of Ames Test

Mitra Hatefi[1*] Maryam Ebrahimi Taj Abadi، Mehdi Zand Karimi، Mehdi Roohi Biroon

In this study, antimutagenesis properties of twenty one strains of lactic acid bacteria derived from fermented dairy products were examined. Highest level of antimutagenesis effect was observed in probiotical strain named *Lactobacillus plantarum* with 72% inhibition of mutagenesis.

At first twenty one strains derived from dairy fermented product were examined preliminarily but fifteen strains showed very excellent results. Then rest of analysis were continued with them.

In this test, special strain of *Salmonella typhymurium* was used that had selective mutation in their operon histidine. Mutant strains (His^-) were grown on culture media containing minimum salt and glucose in the presence of mutagen substance above. So only those bacteria that reversed by mutation (His^+) could grow and form colonies on culture media (probiotic culture media extracts) plus mutagen substances are gathered, the rate of reversed mutation is reduced and the percentage of mutation inhibition can be calculated by means of the formula. In addition, the significant difference between the average of revertants per plate of the sample in relation to the mutagens was assessed by using statistical software SPSS and interpreted by one-way variant statistical test.

The results of antimutagenesis examinations in *in vitro* showed that *Lactobacilus casei* from indigenous fermentative products had high levels of probiotic value in comparison with other strains. In this case we observed 72% inhibition of mutation in indigenous strains *(Lactobacilus casei)* and lowest was related to *Lactobacilus rhamnosus* which was about 10% inhibition of mutation.

Probiotics, *Lactobacilus casei*, *Salmonella typhymurium*, Antimutagenicity Effect, Ames test

شناسه: OH17

ارزیابی تأثیرات ضد کاندیدایی باکتری های لاکتیک جدا شده از ماست های محلی استان گلستان

[a] امیر شریعتی*، [a] الهه کیائی، [b] حمید رضا پردلی، [a] آی ناز خادمیان

[a] باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

[b] عضو هیئت علمی گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان

باکتر های اسید لاکتیک به جهت تولید طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی و همچنین قابلیت کنترل رشد میکروب های نامطلوب از اهمیت ویژه ای برخوردارند و همواره مورد توجه بوده اند. *کاندیدا آلبیکنس* یکی از قارچ های مخمری بسیار مهم در انسان محسوب می شود و علاوه بر اینکه به عنوان فلور طبیعی مشاهده شده است، طیف وسیعی از عفونت های موضعی و سیستمیک را ایجاد می کند. این مطالعه با هدف ارزیابی پتانسیل ضد کاندیدایی باکتری های لاکتیک جدا شده از ماست های محلی استان گلستان، صورت گرفت.

نمونه برداری از 25 نمونه ماست تولیدی در مناطق مختلف استان، به منظور جداسازی باکتری های لاکتیک در محیط کشت MRS agar انجام شد. جهت بررسی تأثیرات بازدارندگی، روش انتشار در آگار علیه سویه استاندارد و همچنین ایزوله های بیمارستانی *کاندیدا آلبیکنس*، مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق 15 گونه مختلف لاکتوباسیلوس جداسازی شد که بر اساس نتایج بدست آمده 7 گونه واجد خاصیت ضد قارچی بودند. طی آن بیشترین تأثیرات مربوط به *لاکتوباسیلوس سیک* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه لاکتیس بود.

به طور کلی برخی از گونه های لاکتوباسیلوس فعالیت ضد قارچی مؤثری داشته و از این رو استفاده از آنها به عنوان پروبیوتیک در محصولات لبنی نظیر ماست در کنترل عفونت های ناشی از *کاندیدا آلبیکنس* مؤثر خواهد بود.

کلمات کلیدی: باکتر های اسید لاکتیک، ماست، اثر ضد قارچی، *کاندیدا آلبیکنس*

Evaluation of the Anticandidal Effects of Lactic acid Bacteria Isolated from Local Yoghourt in Golestan Province

[a] Amir Shariati[*], [a] Elaheh Kiaei, [b] Hamid Reza Pordeli, [a] Aynaz Khademian

[a] Young Researchers Club, Islamic Azad University of Gorgan Branch

[b] Academic Member of Microbiology, Islamic Azad University of Gorgan Branch

Lactic acid bacteria are important to producing the wide spectrum of the antimicrobial agent and also inhibitory effects on the harmful microorganism growth. *Candida albicans* is the one of the fermentative yeastlike fungi that acts as native microflora, in addition it cause the broad spectrum of many type of human infections. This study was designed to evaluation of the anticandidal activity of lactic acid bacteria that was isolated from countryside yoghourt in Golestan province.

25 yoghourt samples are collected from different rural places. MRS agar medium was used in order to isolation of lactic acid bacteria. Then the anticandidal effect of isolates was evaluated by disk diffusion method.

15 strains of lactobacillus were isolated from yoghourts. According to results 7 strains had antifungal activity, *Lactobacillus sake* and *Lactobacillus delbrueckii* sub species lactis had the most effects.

Some of the lactobacillus strains have antifungal effects, they are important in dairy products such as yoghourt as probiotic in human health and control of infective microorganisms like *Candida albicans*.

Keywords: Lactic acid bacteria, yoghourt, antifungal activity, *Candida albicans*

شناسه: OH18

جداسازی و استفاده صنعتی باکتری های لاکتیکی مهم در صنعت لبنی و پروبیوتیک

میردامادی سعید[1] ، احمدی به آذین هدی[2*] ، زارع داوود[1]، پور قاسمیان مجید [3] ، فائزی قاسمی محمد[2] ،آقا قزوینی شادی[1]**

دانشیار و عضو هیئت علمی سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ،

تهران ، خیابان فرصت شماره 71 ، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ، پژوهشکده بیوتکنولوژی

دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان 3- کارخانه پگاه گیلان

ماست محصول تخمیر شیر است. مهم ترین دلیل برای تخمیر شیر افزایش عمر مفید آن و از دیگر مزایای تخمیر شیر می توان به بهبود مزه شیر، افزایش قابلیت هضم و غیره اشاره کرد که امروزه می توان، توان استفاده به عنوان منبع پروبیوتیک را نیز بدان افزود. اجزاء اصلی سازنده ماست ، شیر و استارتر کالچر ها هستند که می توان با افزودنی های دیگر نظیر : محصولات شیری، شیرین کننده ها، تثبیت کننده ها ، مواد عطر وطعم دهنده ، پروبیوتیک ها و فرآورده های میوه ای محصولات متنوع دیگری را ایجاد کرد. در ایران تولید ماست قدمتی طولانی دارد ولی مایه ماست (باکتری های لاکتیکی) که از اجزای مهم و اصلی تولید آن است جزء مواد وارداتی است. اخیرا سویه های مهم لاکتیکی که در تهیه لبنیات استفاده می گردد نیز به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته و در برخی نمونه های ماست تولیدی در ایران این سویه ها با غلظت بالا به عنوان پروبیوتیک استفاده می گردد. به منظور جداسازی سویه های صنعتی باکتری های لاکتیک ، نمونه ها در محیط MRS وM17 کشت داده وباکتری ها از هم تفکیک وجداسازی شدند. پس از بررسی فرمولاسیون های مختلف از سویه های جدا شده بهترین آن انتخاب وبه طور آزمایشگاهی و با نسبت های ترکیبی مختلف تست گردید. همچنین نمونه ها لیوفیلیزه و فریز شدند و تفاوت آن از نظر viability و کیفیت محصول تولیدی با کشت زنده مقایسه گردید. با توجه به قیمت گران M17 و MRS ، محیط ارزان با پایه آب پنیر (whey) طراحی گردید. این محیط جهت تولید صنعتی سویه های لاکتیکی تولید کننده ماست ، پنیر و پروبیوتیک ها مورد استفاده قرار گرفت.

بر این اساس 9 سویه باکتری جداسازی شد که شامل 3 سویه لاکتو باسیلوس و 6 سویه لاکتوکوکوس بودند که با توجه به اهمیت بافت، طعم ، pH و خواص دیگر، ماست تولید شده توسط این سویه ها مورد آزمایش حسی قرار گرفتند. لا کتو باسیل های L1 ، L2،L3 بر اساس تاثیرشان بر pH به صورت L3> L2> L1 بودند . در کوکسی ها S8 ، S12 ، S13 تاثیری بر pH نداشتند ولی S7 ،S9 ،S10 برpH

در Post acidification موثر بودند. نمونه هاتولید شده در حجم صنعتی در محیط آب پنیر (whey) جهت تست به کارخانه پگاه گیلان ارسال و در خط تولید ماست به صورت صنعتی استفاده گردید.

کلمات کلیدی: استارتر کالچر ، ماست ، پروبیوتیک ، تولید، باکتری های لاکتیکی

Isolation and investigation of different strains of important industrial lactic acid bacteria

Mirdamadi, Saeed **[1], Ahmadi Beh Azin Hoda*[2], Pourghasemian Majid [3] , Faezi ghasemi Mohamad [2], Agha ghazvini Shadi[1]

****Associated Professor, Mirdamadi_sa@yahoo.com**

1-Iranian research organization for Science and Technology, (IROST), 71, Forsat Str., Tehran, IRAN

2-Azad University , Lahijan, 3- Pegah Factory Rasht

Yoghurt is product of milk fermentation. Fermentation was used for increasing the shelf-time of milk for centuries. Moreover, improving milk taste and digestibility are concerned as advantages of milk fermentation. Nowadays, they are considered as a source of probiotic bacteria and act as a functional food. Yoghurt is made by milk and starter cultures. However, other substances such as milk products, sweaters, stabilizers, flavor and fruit can be add to produce different kind of yoghurt. In Iran, yoghurt has been produced for a long time. But starter cultures are imported and Iran has not yet been able to produce them. Recently, the important bacterial strains which are used as starters in dairy products are also utilized as probiotic. In order to isolate the industrial strains of starter culture, the sample was cultivated in MRS and M17. After isolation, different formulations for isolated strains were examined and the best formula was selected to be use for further experiments. The role of isolated bacteria on flavor and texture of yoghurt were investigated. The lyophilized and freeze forms of strains were prepared in order to compare the viability of them with active cultures of isolated bacteria. Because of the high price of M17 and MRS, a whey based medium was designed. The medium was utilized in order to produce industrial yoghurt and cheese Lactic Acid Bacteria and probiotic. Accordingly, 3 *Lactobacillus* strains and 6 *Streptococcus* strains were isolated. Sensory properties of yoghurt, which was produced by isolated strains, were assessed according to texture, flavor, pH and other features. All isolated bacteria were transferred to Pegah Corporation to be test in industrial scale at yoghurt production line.

Key words: Starter culture, Yoghurt, probiotic, Production, lactic acid bacteria

شناسه: OH19

تأثیر استفاده از مخمر و الیگوساکاریدهای‌مانان بر تجزیه‌پذیری درون کیسه‌ای مواد خوراکی در گوسفند

باقری ورزنه مریم[1]، قربانی غلامرضا[2]، خوروش محّمد[2]، اسدی الموتی علی**

[1]دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد [2]دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی bagheri_m58@yahoo.com

استفاده از مقدار زیاد غلات سریع الهضم درجیره نشخوارکنندگان باعث به خطر افتادن سلامت اکوسیستم شکمبه و کاهش عمر تولیدی دام می‌گردد. یکی از راه‌های حل این مشکل استفاده از افزودنی‌های میکروبی از جمله مخمرها در تغذیه نشخوارکنندگان است. کربوهیدرات‌های دیواره سلولی مخمر، افزودنی‌های دیگری هستند که با اهداف مختلف از قبیل جذب مایکوتوکسین‌ها در جیره نشخوارکنندگان استفاده می‌شوند. در برخی افزودنی‌های تجاری این ترکیبات به همراه مخمرها وجود دارند. با این حال، اطلاعات زیادی در مورد تأثیر این ترکیبات بر هضم و تجزیه‌پذیری مواد خوراکی در محیط شکمبه و بر هم کنش آن‌ها با مخمرها وجود ندارد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر استفاده از مخمر و کربوهیدرات‌های دیواره سلولی آن بر تجزیه‌پذیری یونجه و جو در شکمبه انجام گرفت. از 4 رأس گوسفند بالغ آمیخته که در ناحیه شکمبه فیستولا گذاری شده بودند در یک طرح مربع لاتین 4 × 4 استفاده شد. تیمارها عبارت بودند از: 1- جیره پایه (حاوی 60 درصد دانه جوی کامل و 40 درصد یونجه خشک) بدون افزودنی، 2- جیره پایه + 1/2گرم الیگوساکاریدمانان (به عنوان کربوهیدرات حاصل از دیواره سلولی مخمر) در روز به ازاء هر رأس، 3- جیره پایه + 0/2 گرم مخمر در روز به ازاء هر رأس، 4- جیره پایه +مخلوط الیگوساکاریدمانان و مخمر. در هر یک از 4 دوره 18 روزه 10 روز برای عادت پذیری و 8 روز جهت نمونه برداری اختصاص یافت. تجزیه‌پذیری درون کیسه‌ای یونجه، جو و مخلوط 40 به 60 آن دو، در ساعات 2، 4، 8، 12، 24، 48 و 72 ساعت تعیین شد. پس از پایان زمان کیسه‌گذاری کیسه‌ها از شکمبه خارج شدند و بعد از آبکشی در آون خشک گردیدند و از طریق تفاضل وزن، میزان تجزیه پذیری ماده خشک تعیین شد. در روز 18، pH مایع شکمبه در ساعات0، 1/5، 3، 5 و 9 بعد از مصرف خوراک وعده صبح تعیین گردید. تعداد پروتوزوآ با استفاده از رنگ آمیزی MFS شمارش شد. پارامترهای تجزیه‌پذیری با استفاده از یک مدل غیر خطی برآورد گردیدند. تجزیه پذیری مؤثر ماده خشک با فرض این که سرعت عبور مواد از شکمبه 5 درصد و 8 درصد در ساعت است محاسبه شد. تیمارها تأثیری بر نیتروژن آمونیاکی و تعداد پروتوزوآ نداشتند ($P>0/05$). کل اسیدهای چرب فرار در گوسفندانی که تنها از الیگوساکاریدمانان استفاده کرده بودند تمایل به کاهش داشت ($P=0/10$). pH شکمبه در گوسفندانی که مخلوط مخمر و الیگوساکاریدمانان را مصرف کرده بودند کمتر از گروه شاهد بود. تجزیه‌پذیری ماده خشک یونجه در گوسفندانی که از ترکیب

مخمر و الیگوساکاریدمانان استفاده کرده بودند کم تر از شاهد و سایر تیمارها بود. کل بخش تجزیه‌پذیر یونجه نیز در حضور مخمر کاهش معنی‌داری یافت (P =0/07). هم چنین تجزیه‌پذیری مؤثر دانه جو با مخلوط مخمر و الیگوساکاریدمانان نسبت به گروه شاهد کمتر بود. نتایج این آزمایش نشان داد که مخمر باعث کاهش تجزیه‌پذیری علوفه یونجه در جیره‌های پر غله می‌گردد. بی اثر بودن الیگوساکاریدمانان بر تجزیه‌پذیری ممکن است به علت تجزیه شدن آن در شکمبه باشد.

واژه‌های کلیدی: مخمر، الیگوساکاریدمانان، تجزیه پذیری، نشخوارکننده

Effect of yeast and yeast cell wall carbohydrates on *in situ* degradability of feedstuffs in sheep

Bagheri Varzaneh Maryam, Ghorbani Gholamreza, Khorvash Mohammad, Asadi Alamouti Ali**

Isfahan University of Technology, Department of Animal Science, Isfahan,Iran. Bagheri_m58@yahoo.com

Feeding high amounts of fermentable carbohydrates can result in ruminal disorders and decrease productivity of ruminant animals. Direct fed microbials (e.g. live yeast; LY) are claimed to re-balance ruminal microbial ecosystem in such dietary conditions and help to reduce metabolic disorders. Alternatively, yeast cell wall carbohydrates (i.e. mannan-oligosaccharides, MOS) with a proven effect on mycotoxin absorption in the rumen, are incorporated into some commercial feed additives in combination with LY products. Research results, however, are few regarding effects of MOS on degradability of feedstuffs in the rumen. Objectives of the current study were to study these effects. Four ruminally fistulated sheep consuming a basal diet with 40% alfalfa hay and 60% whole grain barley (on DM basis) were randomly assigned to one of the four treatments; 1- Control diet (no additive); 2- Basal diet with MOS (1.2 gr/h/d); 3- Basal diet with LY (0.2 gr/h/d); 4-Basal diet with MOS + LY. Each of the four experimental period lasted 18 d with the last 8 d for *in situ* incubations and ruminal sampling. The degradabilities of alfalfa hay, barley grain and mixture of alfalfa: barley grain were determined using the nylon bag technique. Duplicate samples were ground to pass a 2 mm screen and inserted in the rumen of sheep for 2, 4, 8, 16, 24, 48, and 72 h. After incubation runs, bags were rinsed with gentle current of tap water until a clear filtrate was apparent. Bags were then oven dried and the DM degradability was determined. On d 18, ruminal samples were taken at 0, 1.5, 3, 5, and 9 h after morning feeding and pH was determined. A representative sample was preserved with MFS solution and used for protozoa counting. Degradability parameters were estimated using original non-linear exponential model. Effective degradable DM (EDDM) was calculated assuming a rumen outflow rate of 0.05 and 0.08/h. Treatments did not affect NH_3-N concentration and protozoal numbers in sheep received the experimental diets (P > 0.05). The volatile fatty acid production tended to decrease by MOS. Overall, mean ruminal pH was lower in sheep supplemented with MOS + LY than other treatments. For barley grain, the EDDM was lower with MOS + LY and for alfalfa hay total potential degradability was lower with LY , and DM degradability was lower with MOS + LY (P < 0.05). Results suggest that LY decreases the degradability of alfalfa hay in high- grain diets. That MOS had no effect on degradability parameters of feedstuffs may imply that it is degraded in the rumen.

Key word: Yeast, Mannan-oligosaccharides, degradability, ruminant

شناسه: OH20

ارزیابی خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلهای دستگاه گوارش جوجه های گوشتی

مجیدزاده هروی، رضا[*]؛ کرمانشاهی، حسن[**]؛ وارسته، عبدالرضا[‡]؛ سنکیان، مجتبی[‡]؛ موسوی هروی ،علیرضا[†]

[*]دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی مشهد rmajid_heravy@yahoo.com

[**] عضو هیات علمی دانشگاه فردوسی مشهد hassanbird@yahoo.com

[*]،[**]،[†] گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[‡] بخش ایمنوبیوشیمی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

باکتریهای لاکتوباسیل جایگاه ویژهای در صنعت ساخت پروبیوتیک دارند و تقریبا در تمام محصولات پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می گیرند. دلایلی که برای توجه به این جنس از باکتریها بیان می شود شامل: 1- بوسیله خاصیت ممانعت رقابتی از رشد باکتریهای مضر جلوگیری می کنند 2- این باکتریها قابلیت اتصال به سلولهای اپیتلیوم روده را دارند. 3- آنها میکروارگانیسمهای همزیستی هستند که باعث افزایش عملکرد سیستم ایمنی می شوند. هدف از انجام این مطالعه بررسی قابلیت پروبیوتیکی چند گونه لاکتوباسیل جدا شده از دستگاه گوارشی جوجه گوشتی است.

39 گونه لاکتوباسیلی جدا شده از بخشهای مختلف دستگاه گوارش جوجه های گوشتی به روش سکونس DNA در ناحیه 16S ریبوزومی تعیین گونه گردید. تست اتواگریگاسیون برای همه گونه ها انجام شد و 8 گونه که زمان اتواگریگاسیون قابل قبولی داشتند (زیر 90 ثانیه) برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند. مقاومت باکتریها به محیط اسیدی در pH های 2، 3 و 4 در زمانهای مختلف (1،2،3 و 4 ساعت) آزمون شد. همچنین آزمایش مقاومت به عصاره صفرای و رشد در محیط حاوی سدیم تروکولات برای هر گونه لاکتوباسیل در 4 تکرار انجام گرفت.

میزان آبگریزی هر گونه با تعین آبگریزی سطحی سلول در دو هیدروکربن غیر قطبی (زایلان و هگزادکان) تعیین گردید. این آزمایش میزان اتصال باکتری به سطح سلولهای اپیتلیوم روده را نشان می دهد. در ارتباط با این آزمایش چسبندگی لاکتوباسیلها به سلولهای اپیتلیوم چینه دان نیز تعیین شد. چسبندگی حداقل 10 باکتری به یک سلول اپیتلیوم نتیجه قابل قبولی را نشان می داد. همچنین قابلیت تولید H_2O_2 بعنوان عاملی در افزایش توانایی اشغال جایگاه های اکولوژیک روده تعیین شد.

در این مطالعه 4 سویه لاکتوباسیل کریسپاتوس، 2 سویه لاکتوباسیل سالیواروس، و یک سویه لاکتوباسیل روتری و جانسونی اتواگریگاسیون مناسبی را نشان دادند. لاکتوباسیل کریسپاتوس (C8) و لاکتوباسیل کریسپاتوس (cecu10) مقاومت مناسبی به اسیدیته و عصاره صفراوی نشان دادند اما لاکتوباسیل روتری (cecu4) علیرغم مقاومت به اسیدیته ایده آل، مقاومت مناسبی را در برابر عصاره صفراوی نشان نداد ضمن اینکه قابلیت تولید H_2O_2 نیز نداشت. رشد همه باکتریها در حضور سدیم تائوروکولات افزایش یافته بود. هشت گونه لاکتوباسیل بر اساس اتواگریگاسیون در زمان کمتر از 90 دقیقه انتخاب شدند. بطور طبیعی لاکتوباسیلها زمان اتواگریگاسیونی کمتر از سایر باکتریها دارند و این به دلیل فاکتور محرک اتواگریگاسیون در این باکتر ها است. هیچکدام از باکتریها تحت تاثیر pH=4 و 5 قرار نگرفتند.

لاکتوباسیل کریسپاتوس (C8) و روتری (cecu4) در pH های بحرانی مقاومت بیشتری داشتند(pH های 2 و 3). بنابراین تصور می شود که مکانیسمهای مقاومت به محیط اسیدی از قبیل ظهور ژن *clpL* یا کاهش گرادیانی pH داخل سلولی در هر دو گونه لاکتوباسیل فعال می باشد.

همچنین لاکتوباسیل کریسپاتوس (cecu10) رشد قابل قبولی در حضور عصاره صفراوی نشان داد، این باکتری چسبندگی مناسبی به سلولهای اپیتلیوم داشت. وجود آنزیم هیدرولاز صفراوی در این دو گونه از لاکتوباسیلها تعیین شده است. علیرغم خصوصیات مناسب لاکتوباسیل کریسپاتوس (C8)، این سویه چسبندگی مناسبی را به سلولهای اپیتلیوم نشان نداد.

بنابراین تولید H_2O_2، آبگریزی سطحی مناسب و چسبندگی سلولی قابلیت هایی بودند که لاکتوباسیل کریسپاتوس (cecu10) را برای اهداف پروبیوتیکی مناسب نشان می دهد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، باکتریهای لاکتوباسیل، دستگاه گوارش، جوجه گوشتی

The Evaluation of probiotic characters of Lactobacilli isolated from the gastrointestinal tract of broiler chickens

Majidzadeh Heravi*, Reza; Kermanshahi, Hassan; Varasteh, Abdolreza‡; Sankian, Mojtaba‡; Mousavi Heravi, Alireza†**

* PhD student, rmajid_heravy@yahoo.com

** Scientific board of Ferdowsi University, hassanbird@yahoo.com

*, **, †Department of animal science, agriculture faculty, Ferdowsi University, Mashhad

‡Department of immunobiochimistry, Buali (Avicenna) Research Institute, Mashhad University of Medical Sciences

Introduction Lactic acid bacteria have a special place in the probiotic industry and they are used almost in all probiotic production. There are good reasons for this attention: 1- Lactobacilli inhibit growth of pathogenic bacteria by “competitive exclusion”. 2- They can attach to epithelial cells in the intestine. 3- They are symbiotic organisms for the host and may increase immune system performance. In this study, several species of Lactobacilli from the gastrointestinal tract of broiler chickens were screened for probiotic potential.

Mateial and methods Thirty nine lactobacilli species were isolated from different parts of the gastrointestinal tract and determined by the 16S ribosomal DNA sequencing method. Auto-aggregation tests were performed for all species and eight species that had an acceptable auto-aggregation time (below 90 minutes) were selected for the next experiments. Resistance to acidity was performed for selected bacteria in pH 2, 3 and 4 for different times (1, 2, 3 and 4 hours). Also resistance to ox bile extract and sodium taurocholate was accomplished for each species in four replications. Rate of hydrophobicity for each species was measured by surface hydrophobicity tests in two non-polar hydrocarbons (hexadecane and xylem). This test reveals auto-aggregation and attachment rate of bacterium to surface epithelial cells of the intestine. In relation to this experiment, adhesion of lactobacillus to crop epithelial cells was performed. Adhesion of a minimum of 10 bacteria to one epithelium cell was an acceptable result. Also H_2O_2 production was tested as ability to occupy sites in the gastrointestinal tract.

Results In this study, four strains of *Lactobacillus crispatus*, 2 strains of *L.salivarous* and one strain each of *L.reuteri* and *johnsonii* showed acceptable auto-aggregation results. *Lactobacillus crispatus* (C8) and *L.crispatus*(cecu10) had suitable resistance to acidity and ox bile but *L .reuteri* (cecu4) didn’t acceptable resistance in the presence of bile and had no H_2O_2 production ability. The growth of all of the lactobacilli was increased in presence of sodium taurocholate.

Discussion Eight lactobacilli species were selected based on auto-aggregation time below 90 minutes. The statement that lactobacilli bacteria have better auto-aggregation time than other bacteria has been raised by detecting auto-aggregation promoting factor (AFG) in lactobacilli. It is responsible of cellular auto-aggregation. None of bacteria were affected by pH=4 and 5. *L.reuteri*(cecu4) and *L.crispatus*(C8) had more resistance in critical pHs (2 and 3). Therefore, It appears reasonable to assume that the pH resistance mechanisms such as appearance of *clpL* gene or gradient decrease of internal cellular pH are active in both lactobacilli. *L.crispatus* (cecu10) showed acceptable growth in presence of ox bile extract also, it had a good adhesion to **epithelium**. It is declared that the bile salt hydrolase activity is assessed in this lactobacillus. In spite of convenient characters of *L.crispatus* (C8), this strain didn’t show good adhesion. Therefore H_2O_2 production, hydrophobicity and cell attachment are some advantage to candidate *L. crispatus*(cecu10) for probiotic purposes.

Keyword: Probiotic, lactobacilli, gastrointestinal tract, Broiler chick

شناسه: OH21

تاثیر سطوح متفاوت پروبیوتیک پروتکسین جیره غذایی بر شاخص هپاتوسوماتیک ماهی زینتی اسکار

نوری فائقه ، فیروزبخش فرید f.n000@yahoo.com37

دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

به منظور بررسی تاثیر پروبیوتیک پروتکسین بر شاخص هپاتوسوماتیک ماهیان زینتی اسکار، آزمایشی به مدت 8 هفته انجام شد. این آزمایش در قالب 4 تیمار و3 تکرار با سطوح مختلف 0/15، 0/5 و 1 گرم به ازای هر کیلوگرم غذای خشک در مقایسه با تیمار شاهد طراحی گردید.

آزمایش بصورت طرح کاملا" تصادفی در آکواریوم های 100 لیتری با تعداد 12 قطعه بچه ماهی اسکار با میانگین وزن اولیه 0/12± 4/92 گرم در هر آکواریوم صورت پذیرفت. نرخ تغذیه بر اساس 4 درصد وزن بدن و3 نوبت در روز انجام شد. در طول دوره سه بار نمونه برداری(شروع آزمایش، پایان هفته چهارم و پایان دوره) و در هر بار تعداد 3 قطعه بچه ماهی از هر آکواریوم جهت تعیین وزن بدن و وزن کبد نمونه برداری شدند و در پایان دوره آزمایش شاخص کبدی(HSI)(وزن کل بدن/وزن کبد) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج بدست آمده نشان داد استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی ماهیان اثرات مثبتی بر افزایش شاخص کبدی ماهیان زینتی داشته بطوریکه با افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی نسبت وزن کبد به وزن کل بدن ماهیان در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معناداری($p<0/05$) یافت و از بین سطوح مختلف پروبیوتیک تیمار حاوی 0/15 گرم پروبیوتیک به ازای کیلوگرم غذای خشک در مقایسه با سطوح دیگر بالاترین توان را در افزایش شاخص کبدی ماهیان نشان داده است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پروتکسین، شاخص هپاتوسوماتیک، اسکار

Effect of different levels of probiotic protexin on hepatosomatic index(HSI) in ornamental fish of oscar

Noori, F ., Firouzbakhsh, F f.n000@yahoo.com

Graduated From Collage of Agricultural and Natural Resources of Islamic Azad University, Sience and Research Campus, Tehran, Iran. Asistant professor, Department of Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran .

To evaluate the effect of probiotic on hepatosomatic index in ornamental fish fed on experimental diets compared to control treatment, probiotic protexin was tested on oscar fry(the average weight= 4.92±0.12 gr) during the 8 weeks. This experiment was conducted in a completly random desing in four treatment and three replicates with 12 fry per aquarium. Probiotic was introducted in diets at three different levels(T1:0.15 ,T2:0.5 ,T3:1 grpb/kg feed) and their effects compared with those of control diet containing no probiotic. The rate of feeding was on the base of the 4 percent of body weight for 3 times a day. Among the period, three times of sampeling had done(at the beginning of the experiment, at the end of the 4th week and the final of period) and every time, sampled 3 fry fish from each aquarium determine body weight and liver weigh, and the final of period was evaluated hepatosomatic index. The results indicated that used of probiotic in feed were caused increasing of hepatosomatic index in fish and increased relative of liver weight to total body weight compared to control treatment and Between different levels of probiotic, treatment of 0.15 gr probiotic per kg feed showed the highest ability in increasing of hepatosomatic index compared to other levels.

Key word: probiotic, protexin, hepatosomatic index(HSI), oscar

شناسه: OH22

جداسازی وتعیین خصوصیات پروبیوتیکی باسیلوس‌های بومی ایران، جدا شده از مرغداری‌های شهرستان اراک

کرمی مسعود [1]، قائمی ناصر [2]، جعفری پروانه [3]، دکتر امیر مظفری ثابت نور [4]، عبدالوند یاسر [1]**

1- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد لاهیجان

2- دانشیار دانشگاه تهران پردیس علوم ،گروه بیوتکنولوژی

3- اسیادیار دانشگاه آزاد اراک ،گروه میکروبیولوژی

4- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروب شناسی

باکتری‌های پروبیوتیک خوراکی با توانائی تغییر فلور میکروبی روده نقش مهمی در سلامت بدن بازی می‌کنند. پس از مصرف، در ناحیه روده ساکن شده و اثرات مفید خود را اعمال می‌نمایند. همچنین پروبیوتیک‌ها جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها هستند. هدف این تحقیق غربال‌سازی باسیلوس‌های بومی اراک جداشده از مرغداری‌ها و ارزیابی خصوصیات پروبیوتیک‌آن‌ها می‌باشد.در این تحقیق 41 نمونه از فضولات تازه از 8 مرغداری مختلف جمع‌آوری شد. پس از غنی‌سازی و تیمار حرارتی، باکتری‌های اسپوردار غربال شدند. سپس خصوصیات پروبیوتیکی سویه‌ها (مقاومت به اسید، صفرا، پپسین و عصاره سنگدان و تولید ترکیبات ضدمیکروبی) تعیین شد.در این تحقیق 140 سویه باسیلوس غربال و 14 سویه به واسطه عدم همولیز در مطالعات بعدی استفاده شد. بررسی خصوصیات پروبیوتی:ی نشان داد که بیشتر سویه‌ها توانایی رشد در 10٪ نمک را داشته، سویه 7 بیش از 91/7٪ به اسید کلریدریک مقاوم بوده در حالی که سویه 9 و 10 100٪ به نمک‌های صفراوی (کولات و داکسی‌کولات‌سدیم) مقاوم بودند. سویه‌های انتخابی به عصاره سنگدان و پپسین مقاوم بوده (بیش

از 80٪) و توانایی اتصال آن‌ها به سلول‌های روده تحت بررسی است. تمامی سویه‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های معمول مرغداری‌ها همانند سالمونلا و E.coli بودند. این مطالعه نشان داد که سویه‌های انتخابی بالقوه پروبیوتیک بوده و پس از تست‌های تکمیلی و آزمایش میدانی می‌توانند به عنوان پروبیوتیک طیور استفاده شوند در حالی که توانایی ممانعت از بیماری‌های متداول طیور را دارا می‌باشند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، غربالی‌سازی، باسیلوس، فعالیت ضدمیکروبی

Identification of probiotic properties of Iranian native Bacillus, isolated from poultry farms of Arak

Karami Masoud [1] **, Ghaemi Nasser [2], Jafari Parvaneh [3], Amir Mozaffari Sabet Noor [4], abdolvand yaser[1]

1- student of University lahijan M.Sc. Microbiology

2- associated professor of Tehran University

3-assistant professor of Islamic Azad University, Arak Branch, Department of Microbiology

4- associated professor of Iran University

Introduction and objective: the oral probiotic bacteria with ability to change the intestinal microbial flora play an important role as health supplement in body. After ingestion they are residing in intestinal tract and exhibit beneficial effect. Also probiotic bacteria are suitable alternative for (natural) antibiotics. The purpose of this study was screening of Arak native Bacillus isolated from poultry farms and evaluation of their probiotic properties.

Materials and Methods: In this study 41 samples of fecal material were collected from 8 different poultry farms. After enriching and heat treatment, spore-forming bacteria were screened. The probiotic properties of the isolates (Acid, bile, salt, pepsin, and chicken gizzard extract resistance and antimicrobial compound production) were determined.

Results: In this study 140 isolates of bacillus were screened. 14 strains were subjected to more research base on negative haemolysis. Investigation of probiotic properties of isolates showed that most of them could growth in the presence of 10% NaCl, stain 7 was resistance to HCl (up 91.7%) while stains 9 and 10 were completely resistance to bile salts (cholate and deoxycholate sodium). The selected strains were tolerated to chicken gizzard extract pepsin (up to 80%) and their adhesion ability to intestinal cells in under evaluation. All the strains showed antimicrobial activity against the common poultry pathogens such as Salmonella sp.and Ecoli.

Conclusion: This study showed that the isolates are potential probiotics and after complementary and filed experiment they can be used as poultry probiotics with the ability of inhibition of poultry common disease.

Ketwords: Probiotic, Screening, Bacillus, antimicrobial activity

شناسه: OH23

تأثیر پروبیوتیک پریمالاک بر برخی از فراسنجه های خونی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM)

حبیب اللهی رقیه*[1]، سوداگر محمد[2]، حسینی سید عباس[3]، کریم زاده صادق[4]**

دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات – دانشکده شیلات – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

2 و3 – عضو هیأت علمی – دانشکده شیلات – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

4- عضو هیأت علمی مؤسسه آموزش عالی رودکی تنکابن

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که برای بهبود سلامتی حیوان میزبان به مکمل های غذایی اضافه می شوند. وضعیت سلامت خوب ماهیان پیش شرط لازم برای پرورش موفق ماهیان است. به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک تجاری پریمالاک (lactobacillus *acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophium*) بر برخی از فراسنجه های خونی آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM)، آزمایشی به مدت ۱۰هفته در مرکز تحقیقات آبزی پروری دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. بدین منظور پروبیوتیک پریمالاک به جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلا در سه سطح 0.4، 0.9 و 1.4 گرم بر کیلوگرم جیره و گروه شاهد بدون پروبیوتیک اضافه گردید. آزمایش درون تانک های فایبر گلاس 500 لیتری که با 300 لیتر آب پر شده بود در 3 تکرار انجام گرفت. تعداد 70 قطعه بچه ماهی قزل آلا (متوسط وزن۰.۰۴g ±۶.۶۵) به طور تصادفی

درون تانک ها ذخیره سازی و روزانه در ۴ نوبت و به میزان۴ درصد وزن بدن تغذیه شدند. در پایان آزمایش برای تعیین پارامترهای خونی نمونه های خون از باله دمی ۱۵ماهی که به طور تصادفی از هر تانک انتخاب شده بود گرفته شد. در پایان دوره آزمایش فراسنجه های خونی: میزان گلوکز، کلسترول، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین، هموگلوبین(MCV,MCH,MCHC)، هماتوکریت، سدیم، کلسیم، پتاسیم، تعداد گلبول قرمز، تعداد گلبول سفید، کورتیزول مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که میزان گلوکز، کلسیم، تعداد گلبول قرمز،MCV و MCH گروه شاهد با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار ($P<0.05$) می باشد و در سایر فراسنجه ها اختلافی یافت نشد. به عنوان یک نتیجه، این مشاهدات تأیید بر این پیشنهاد که ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک سلامت تر از گروه شاهد می باشند را نشان می دهد.

کلمات کلیدی : پروبیوتیک، فراسنجه های خونی، قزل آلای رنگین کمان

Effect of the primalac probiotic on some hematology parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM)

Habibollahi roghaieh[1]*, sudagar mohammad[2], hoseini seid abbas[3], karimzade sadegh[4]**

1-MSc student - Fisheries Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

, 2,3 - Fisheries Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

4- Tonekabon, rodaki higher education institue

probiotics as living microorganisms added as dietary supplements, which improve the health of host animal.

Good state of health of the fish is the basic precondition for successful fish culture.To evaluate the effects of the commercial probiotic (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, and *Bifidobacterium thermophium*) on some haematology parameters in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM) experimental carried out at the Aquaculture research complex Gorgan University of agricultural science and natural resources for 10 weeks. Probiotic was introduced in diets at three different levels, (T1: 0.4 g, T2: 0.9gr, T3: 1.4gr/kg feed) xand their effects compared with those of control diet containing no probiotic. The feeding experiment was conducted in 500-L fibreglass tanks that filled with 300 L water in the triplicate. Each tank was randomly stocked with 70 fish (mean initial weight: 6.65±0.14gr) and fishes were fed four times daily and daily feeding rate was about 4% of total body weight(g). At the end of experiments for the determination hematology parameters, blood was collected from the caudal vein of fifteen randomly selected fish per tank. hematology parameters (hemoglobin,MCH,MCV.MCHC, cholesterol, haematocrit, red blood cell(RBC) and white blood cell(WBC), total serum protein, Ca^{+2}, $Na^{+1.}$, k^{+1}, glucose. Cortisol, albumin and globulin) were analyzed at the end of experiment. The results show that glucose concentration, calcium, RBC, MCH and MCV were significantly different among treatments and control ($P<0.05$) but another hematology parameters found no difference between treatments and control. As a result, this observation indicates support for the suggestion that fish fed probiotic-supplemented diets were healthier than the control.

Key words: probiotic, hematology parameters, *Oncorhynchus mykiss*

شناسه: OH24

برسی روش های تجویز پروبیوتیک پروتکسین در هچری بر بازیابی سالمونلا آنتریتیدیس در محتویات سکوم و لوزه سکومی جوجه های گوشتی

رشیدی علی اصغر *، لطفی پویا **

دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر(ali.rashidi.1749@gmail.com)* دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر(pooya_lotfi2002@yahoo.com) **

این آزمایش با هدف برسی تاثیر روش های مختلف تجویز پروبیوتیک پروتکسین در هچری بر بازیابی سالمونلا آنتریتیدیس در محتویات سکوم و لوزه سکومی جوجه های گوشتی انجام شد.90 قطعه جوجه گوشتی سویه راس 308 به سه تیمار تقسیم شدند.یک تیمار شاهد و دو تیمار روش های مختلف تجویز پروبیوتیک در هچری، شامل تزریق به تخم مرغ و افشانه. در هر تیمار 3تکرار و در هر تکرار 10 جوجه قرار داشت.

نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه آماری شد. همه پرندگان یک روز بعد از دریافت پروبیوتیک با Log_{10} CFU/g سالمونلا انتریتیدیس چالش داده شدند. یک و هفت روز بعد از چالش برای ارزیابی سالمونلا از محتویات سکوم و لوزه سکومی 10 پرنده از هر

تیمار نمونه برداری شد و با تکنیک کشت مورد برسی قرار گرفتند. به ترتیب بیشترین میزان آلودگی محتویات سکوم در یک روزگی در تیمار شاهد، تزریق تخم مرغ و افشانه مشاهده شد($P<0.05$).

بیشترین میزان آلودگی محتویات سکوم در هفت روزگی در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار افشانه مشاهده شد که تفاوت آن با تیمار تزریق تخم مرغ معنی دار نبود($P<05$). میزان آلودگی محتویات سکوم از یک روزگی تا هفت روزگی افزایش پیدا کرد که احتمالا به دلیل استقرار سالمونلا و تکثیر در دستگاه گوارش بود.

از نظر بازیابی سالمونلا از لوزه سکومی یک روز بعد از چالش تفاوت معنی داری بین گروه های مختلف مشاهده نشد. در هفت روزگی بیشترین میزان آلودگی در تیمار شاهد مشاهده شد (0.83) و میزان آلودگی در تیمار های دیگر تزریق تخم مرغ 0.70 و افشانه 0.64 بود و تفاوت آن معنی دار بود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک پروتکسین، هچری، سالمونلا آنتریتیدیس، سکوم، جوجه گوشتی

Studying the methods of probiotic Protoxin prescription in hatchery on *Salmonella Enteritidis* retrieval on cecum Contents and cecum parotid of broiler Chickens

Rashidi,A. A* Lotfi, P**

Postgraduate in Animal Science from Islamic Azad University of kashmar (ali.rashidi.1749@gmail.com)*, M.S.C Student in Animal Science from Islamic Azad University of Kashmar (pooya_lotfi2002@yahoo.com)**

This experiment has been made with the aim of studying the effect of different methods of probiotic Protoxin prescription in hatchery on *Salmonella Enteritidis* retrieval on cecum contents and cecum parotid of broiler chickens .90 broiler chicken Ross 308 were divided in three treatments. One control and two experienced different methods of probiotic in hatchery including injection to the egg and spray. There were three replication in each treatment and 10 chickens in each replication. The results were statistically analyzed in the form of a completely randomized design. All chicken were challenged one day after receiving probiotic by *salmonella enteritidis* Log 10 CFU. Cecum contents and cecum parotid of 10 chickens of each treatment were sampled one and seven days after the challenge and were studied using culture technique. The highest rate of cecum contamination in one-day old age chickens were observed in control treatment, egg injection and spray respectively ($P<0.05$). The highest rate of cecum contamination in one-day old age chickens were observed in control treatment and the lowest were seen in spray treatment which showed no significant difference with egg injection treatment ($P<05$). The rate of contamination increased from one-day old age to seven-day old age. That can be because of salmonella placement and multiplication in digestive tracts. No significant difference were seen among different groups from the point of salmonella retrieval from cecum parotid one day after the challenge. The highest rate of contamination was seen in seven-day old age in control treatment (0.083).The rate of contamination in other treatments were 0.70 in egg injection and 0.64 in spray which showed a significant difference($P<0.05$).

Key words: probiotic Protoxin, hatchery, *Salmonella Enteritidis*, cecum ,broiler chicke

شناسه: OH25

بررسی اثر پروبیوتیکی باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده **از تاسماهی ایرانی(Acipenser persicus)**

[1]اسماعیلی پریسا* ، **[2]امیر مظفری نور**، **[3]شناور ماسوله علیرضا**

[1]کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان parisa4602@yahoo.com

[2]دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

[3]رئیس بخش بهداشت و بیماریها، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری

آزمایشگاه بهداشت و بیماریها ، انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری. رشت.

امروزه واکسنها به تنهایی نمی توانند به عنوان کنترل کننده عمومی بیماریها در آبزیان استفاده شوند بنابر این یک روش جدید، استفاده از باکتریهای پروبیوتیک در کنترل پاتوژنهای بالقوه است. باکتریهای اسید لاکتیک انواع زیادی متابولیت تولید می کنندکه ممکن است بر روی میکروبهای پاتوژن در روده ماهی اثر آنتاگونیستیک داشته باشند.

هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتاگونیستیکی باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از روده قره برون پرورشی علیه پاتوژن معمول ماهیها آئروموناس هیدروفیلا می باشد. اثر هفت باکتری اسید لاکتیک شامل: *Entrococcus* spp. ، *Pediococcus* spp. ، *Leuconostoc* spp. ، *L. plantarum* ، *L. acidofilus* ، *L. fermentum* و *L. viridence* که قبلا از روده تاسماهیان ایرانی جداسازی و شناسایی شدند، به روش Well-diffusion در محیط TSA داخل چاهکها ریخته شدند، بعد از 24 ساعت *Aeromonas hydrophila* بر روی چاهکها کشت داده شد و بعد از انکوباسیون در 30°C به مدت 24 ساعت، اثر ممانعت از رشد آن بررسی شد. از میان باکتریهای مورد بررسی بیشترین هاله عدم رشد توسط *Entrococcus* spp. مشاهده گردید، و باکتریهای *L. acidofilus*، *L. fermentum* هیچ اثر آنتاگونیستی علیه آئروموناس نشان ندادند.balcazar در سال 2005 نشان داد که *Lc. Lactis* و *L. plantarum* و *L. fermentum* جدا شده از روده ماهی قزل آلای رنگین کمان بر *A. hydrophila* موثر بوده و خاصیت چسبندگی آن را به روده میزبان در شرایط in-vitro کاهش می دهند. *L. plantarum* مورد آزمایش در این تحقیق بر علیه *A. hydrophila* موثر بود ولی *L. fermentum* جدا شده از روده ماهی، هیچ اثر آنتاگونیستیکی نشان نداد. Balcazar در سال 2006 از ماهی Salmonid، باکتریهای اسید لاکتیک جدا کرد که اثر ممانعت از رشد بر روی *A. hydrophila* نشان دادند.

کلید واژه ها: باکتریای اسید لاکتیک، *A. hydrophila* ، تاسماهی ایرانی، کنترل بیماریها

Probiotic Effect of Lactic Acid Bacteria from the Intestine of Persian Sturgeon(*Acipenser persicus*)

[1]Esmaeily Parisa [*], [2]Amir mozafari Nour, [3]Shenavar Masoole Alireza

[1]Islamic Azad University of Lahijan

[2]Associate Professor, Iran University of Medical Science, Microbiology Department

[3]The Boss of Health and Disease LAB of International Sturgeon Research Institute

Health and Disease LAB of International Sturgeon Research Institute.Rasht

Introduction**:** These days vaccines could not use as general disease control in aquaculture, so a new method is to use from probiotic bacteria in control of potential pathogens. Lactic acid bacteria (LAB) produce different kinds of metabolites that may display antagonistic effects on pathogenic microbes of fish intestines. The aim of this study was to determine the antagonistic effects of LAB isolated from Persian sturgeons gut against a common fish pathogen called *Aeromonas hydrophila*.

Materials and methods: The effects of seven LAB involve: *Entrococcus spp.* , *Pediococcus spp.* , *Leuconostoc spp.* , *L. fermentum, L. acidofilus , L. viridence , L.plantarum.* that were previously isolated and identified from fish gut studied, by using well-diffusion method. Bacteria were poured in wells on TSA medium, *A. hydrophila* were cultured on medium after 24 hours then after incubation in 30 °C with 24 hours , inhibition of growth effect were studied.

Results: The bigest inhibition zones were observed by *Entrococcus spp.*, and *L. fermentum,* *L. acidofilus* showed no antagonistic effect against *Aeromonas*.

Discussion**:** Balcazar in 2005 showed, Lc. Lactis **,** L. plantarum, L. fermentum that were identified from Rain bow trout were effective on A. hydrophila and in condition of in vitro reduced its adhesion effect to host intestine. L. plantarum that checked in this study was effective against A. hydrophila, but L. fermentum showed no antagonistic effect. Balcazar in 2006 identified lactic acid bacteria from Salmonid that have inhibition of growth effect on A. hydrophila .

Key words**:** Lactic Acid Bacteria, *A. hydrophila*, Persian Sturgeon, Control disease

شناسه: OH26

بررسی اثر پروبیوتیک پریمالاک بر روی برخی فاکتورهای تولید مثلی و رشد در ماهی پلاتی (***Xiphophorus maculatus*** **)**

عباسعلی حاجی بگلو [*،1] ، محمد سوداگر [2]**

دانشجوی کارشناسی ارشد. رشته تکثیر و پرورش آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان haji2005begloo@yahoo.com

استادیار گروه شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

ماخیرا تحقیقات نسبتا زیادی در زمینه نقش پربیوتیک ها در موجودات آبزی صورت گرفته است. اما در زمینه عملکرد پروبیوتیک ها در ماهیان زینتی به ویژه در مورد فاکتورهای تولید مثلی تحقیقات اندکی انجام شده است. در این تحقیق تأثیر پروبیوتیک پریمالاک بر روی برخی فاکتورهای تولید مثلی و رشد در ماهی پلاتی مورد آزمایش قرار گرفت. این آزمایش در قالب 4 تیمار با 3 تکرار طراحی شد. برای این منظور ماهیان پلاتی باکره با سن 20 هفتگی با 4 رژیم غذایی شامل: **A** (شاهد)، **B**، **C** و **D** که به ترتیب حاوی 0، 0/4، 0/9 و 1/4

گرم پروبیوتیک پریمالاک در هر کیلوگرم جیره بود به مدت 26 هفته تغذیه شدند. ماهی ها با تراکم 10 قطعه ماهی ماده و 3 قطعه ماهی نر در هر آکواریوم (با ابعاد 30×40×60 سانتی متر مکعب) روزانه به میزان 3 درصد وزن بدن و در 3 نوبت غذادهی شدند. در پایان دوره آزمایش فاکتورهای مختلف تولید مثلی و رشد برای ماهیان ماده و بچه ماهیان اندازه گیری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.نتایج آزمایش نشان داد که شاخص گنادوسوماتیک در سه گروه آزمایشی به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود (**P**<0/05). بین تیمارهای **C** و **D** از نظر میزان باروری، میانگین تعداد و درصد بقای بچه ماهیان متولد شده اختلاف معنی داری مشاهده نشد (**P**>0/05) اما این مقادیر به طور معنی داری بیشتر از دو تیمار دیگر بودند (**P**<0/05). طول، وزن نهایی و درصد بقای مولدین ماده در گروه شاهد اختلاف معنی داری با سایر گروه ها نداشت (**P**>0/05). به علاوه بالاترین میزان طول و وزن بچه ماهیان متولد شده در گروه **D** مشاهده شد.

کلمات کلیدی: پریمالاک، پروبیوتیک، فاکتورهای تولید مثلی، ماهی پلاتی

Growth and reproductive performance of female platy, *Xiphophorus maculatus*, fed probiotic (Primalac)

Hajibeglou Abasali [*,1], Sodagar Mohamad[2]**

M.Sc. Student of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources haji2005begloo@yahoo.com

Assist. Prof. of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Introduction: Most recently, probiotics has been studied for enhancing growth rate and disease resistance in fish but work on the effects of probiotics on the reproductive performance of fish, especially on ornamental fish, are lacking.

Material and methods: A study to determine the effects of dietary supplementation with probiotic (Primalac) on the growth and reproductive performance of platy, *Xiphophorus maculatus*, was carried out. Virgin platy aged 20 weeks were used in the experiment. There were four treatments, including a control (A), each consisting of three replicates of 10 females and 3 males/replicate, each reared in glass aquarium (60 × 40 × 30 cm^3). Fish were fed under four regimes, 0.0 (control), 0.4 (B), 0.9 (C) and 1.4 (D) Primalac kg^{-1} diet with 3% of their body weight daily in three split doses for 26 weeks.

Results and discussion: The results showed that gonadosomatic index was significantly (P<0.05) higher in the three experimental groups compared to the control group. Though the fecundity of female broodstock, fry production and survival rate of fry between C and D groups were not significantly different (P>0.05), these values were significantly (P<0.05) higher than control and D_2 groups. No significant differences (P>0.05) in survival rate, weight and length of female broodstock were observed between control and experimental groups. Moreover, the highest weight and length of fry was observed in D group.

Key words: Primalac, probiotic, reproductive performance and *Xiphophorus maculatus*

شناسه: OH27

تاثیر سطوح مختلف پروتئین و پروبیوتیک بر عملکرد و صفات لاشه جوجه‌های گوشتی تحت تنش گرمائی

صفامهر، ع[1*]، یعقوب زاده، س[1]، و نوبخت، ع[1]

[1*]- به ترتیب دانشیار، دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم دامی ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مراغه.

Safamehr@yahoo.com

این تحقیق به منظور بررسی اثرات سطوح مختلف پروتئین و پروبیوتیک در جیره‌های‌غذایی جوجه‌های‌گوشتی تحت تنش گرمائی به روش فاکتوریل 3×3 در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار برای هر تیمار (540 قطعه جوجه‌گوشتی سویه راس) به مدت 42 روز بر عملکرد و صفات لاشه انجام گردید. برای این منظور نه جیره بر اساس احتیاجات گزارش شده توسط NRC (1994) تهیه شد که حاوی سه سطح پروتئین مطابق با NRC، 90٪ و 110٪، و سه سطح پروبیوتیک(0، 200 و 400 گرم در تن حاوی 2×10^9 اسپور باکتری)

بودند. پرندگان روزانه 8 ساعت از ساعت 10 صبح تا 18 عصر تحت تنش گرمائی (34 ± 3^{0c}) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزایش وزن بدن در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح پروتئین NRC و 110٪ NRC، به طور معنی‌داری نسبت به جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با پروتئین90٪ NRC، بیشتر بود ($P<0/05$). ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره‌ی غذایی حاوی پروتئین 100 و110٪ NRC، در مقایسه با جیره‌های غذایی با پروتئین90٪ NRC، در دوره‌های آغازین و کل دوره‌ی پرورش، به طور معنی‌داری بهبود یافت ($P<0/05$). تیمار حاوی 110٪ NRC +200گرم پروبیوتیک در تن، در دوره‌های آغازین و کل دوره‌ی پرورش، بطور معنی‌داری ضریب تبدیل غذایی را در مقایسه با تیمارهای90٪ NRC + پروبیوتیک (صفر و 400 گرم/تن) کاهش داد ($P< 0/05$). نتایج این بررسی نشان داد که در تنش گرمائی افزایش پروتئین جیره‌ی غذایی به میزان 110٪ NRC (1994)، واستفاده از پروبیوتیک در سطح 200 گرم پروبیوتیک در تن در جیره‌های غذایی باعث بهبود عملکرد و کاهش اثرات تنش گرمایی توصیه می شود.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، پروتئین، عملکرد، تنش گرمائی، جوجه‌های‌گوشتی

The effects dietary protein levels and probiotic on performance and carcass traits in broiler exposed to heat stress

Dr Safamehr, A.[1*], Yagoobzade, S.[1] and Dr Nobakhat, A.[1]

1- Department of Animal science, Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh-Iran. safamehr@yahoo.com *-

Abstract**:** This experiment was carried out to determine the effects of different levels of protein and probiotic (protexin) on performance, and carcass traits in Ross (308) broiler exposed to heat stress. In this experiment, 540, one-day old broilers were used in a compeletly randomized design with a 3×3 factorial arrangement with 3 replicate for a treatment. The diets were formulated according to NRC (1994) recommendation with protein levels (90, 100 and 110% of NRC recommendations) and probiotic (0, 200 and 400 ppm, containing 2×10^9 cfu/g of spores). The birds were exposed to heat stress (34 ± 3^{0C}) for 8 hours/day (10:00 to 18:00). The results indicated that, in all periods, the body weight gain in broilers fed from NRC and %110 NRC protein were significantly higher than those fed %90 NRC protein ($P<0.05$). Feed conversion ratio of chicks fed diets containing 100 and %110 NRC protein were significantly improved in comparison to %90 NRC protein diet, in 0-21 and 0-42 days ($P<0.05$). The treatment containing %110 NRC protein +200 ppm Probiotic, significantly decreased feed conversion ratio as compared to treatments of %90 NRC+probiotic (0 and 400 ppm) in starter and total periods ($P<0.05$). Generally, the results of experiment indicate that peformance was improved with feeding %110 NRC protein+200 ppm probiotic in broilers exposed heat stress.

Keywords: Probiotic, Protein, Heat stress, Performance, Broiler ckickens

شناسه: OH28

اثر پروبیوتیک تولید کننده فیتاز بر عملکرد و قابلیت هضم فسفر و آهن در جوجه های گوشتی

اقدم شهریار حبیب [1]*، قادری جویباری مهدی [2] ، نریمانی راد محمد [1]و لطفی علیرضا [3]

1–اعضای هئیت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر ha_shahryar@yahoo.com

2– عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

3– عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر

آزمایش حاضر به منظور بررسی تاثیر افزودن دو باکتری (با قابلیت تولید فیتاز) به جیره ی غذایی جوجه های گوشتی، بر عملکرد و قابلیت هضم فسفر و آهن خوراک انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی (CRD) با 4 تیمار، 4 تکرار و 20 قطعه جوجه گوشتی از سویه راس (308) در هر تکرار به اجرا در آمد. تیمار های آزمایشی شامل: 1) عدم استفاده ازباکتری های حل کننده فسفات 2) استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در کل دوره پرورش 3) استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در دوره ی آغازین 4) استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در دوره های آغازین و رشد بود. نتایج بدست آمده نشان دادند که باکتری های مورد آزمایش تاثیر معنی داری بر افزایش، وزن خوراک مصرفی سرانه در بین گروه های آزمایشی در دوره های رشد، پایانی و در کل دوره داشتند($P<0/05$). همچنین تفاوت معنی داری در ضریب تبدیل غذایی بین گروه های آزمایشی در دوره های آغازین، رشد، پایانی و کل دوره مشاهده شد($P<0/05$). باکتری های مورد آزمایش سبب افزایش معنی دار قابلیت هضم فسفر شدند($P<0/05$) ولی اثر معنی داری بر قابلیت هضم آهن نداشتند. از نتایج حاصل چنین استنباط می شود که باکتری های حل کننده فسفات زمانی بیشترین تاثیر را بر عملکرد و قابلیت هضم فسفر را دارند که در کل دوره پرورش به جیره غذایی افزوده شوند.

واژه های کلیدی: باکتری های تولید کننده فسفات، عملکرد، قابلیت هضم، مواد معدنی، جوجه گوشتی

The effect of phytase producer bacteria on performance and digestibility of shosphate and iron in broiler chicks

H. Aghdam shahryar, M. Ghaderi Jouibari, M. Narimani_Rad, A.R. Lotfi

Department of Animal Science, Islamic Azad University, Shabestar branch, Iran

Young researchers club, Islamic Azad University, Ghaem shahr branch, Iran

Young researchers club, Islamic Azad University, Shabestar branch, Iran

The aim of this study was investigation on the effect of phosphate solublizing bacteria in broiler diet on performance and digestibility of phosphate and iron in broiler chicks. In this experiment phosphate solublizing bacteria (PSB) that isolated with screening soil samples collected from various region of Iran used as mixed to diet. The experiment included 320 one-day old broilers from ROSS strain in 3 periods, starter (1-21d) grower (23-35 d) finisher (36-49 d). Birds were randomly allocated to 4 treatments, with 4 replicates of 20 birds. Treatments include T1. Control (basal diet, with no added probiotic); T2 –Control + Probiotic (in starter, grower and finisher); T3 –Control + Probiotic (in starter and grower) and T4 – Control + Probiotic (in starter). In 49 d 4 birds randomly choose from each treatment and allocated in metabolic cage for 11 days, include 7 days adaptation and 4 days for samples collection. Phosphorus was determined with spectrophotometer. Chromic oxide and Fe were determined with atomic absorption. Results obtained shown that probiotic had significant effect on feed intake, weight gain and feed conversion ratio in entire of study and some periods ($P<0.05$).

Probiotic significantly increased phosphate digestibility ($P<0.05$). However, phosphate solublizing bacteria didn't have significant effect on Fe digestibility. These results strongly suggest that phosphate solublizing bacteria as a probiotic can improve performance and phosphate digestibility in broiler. However, more studies are needed to support this hypothesis.

Key words: Phosphate solublizing bacteria, performance, digestibility, mineral, broiler

شناسه: OH29

بررسی اثر باکتری های حل کننده فسفات بر قابلیت هضم کلسیم، فسفر، آهن و روی در جوجه های گوشتی

مهدی قادری جویباری[1]، حبیب اقدم شهریار[2]، محمد نریمانی راد[2] ومحمد گلشن ظروفی[2]

[1]عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد قائم شهر

[2]دانشگاه آزاد اسلامی واحد هریس

آزمایش حاضربه منظور بررسی تاثیر افزودن دو باکتری (با قابلیت تولید فیتاز) به جیره ی غذایی جوجه های گوشتی، بر قابلیت هضم فسفر، کلسیم، آهن و روی خوراک انجام گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی (CRD) با 4 تیمار، 4 تکرار و 20 قطعه جوجه گوشتی از سویه راس (308) در هر تکرار به اجرا در آمد. تیمار های آزمایشی شامل: 1) عدم استفاده ازباکتری های حل کننده فسفات 2) استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در کل دوره پرورش 3) استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در دوره ی آغازین 4) استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در دوره های آغازین ورشد بود. در انتهای دوره پرورشی از هر قفس یک پرنده به قفس های متابولیکی جهت تعیین قابلیت هضم مواد معدنی منتقل شد. باکتری های مورد آزمایش سبب افزایش معنی دار قابلیت هضم فسفر و کلسیم شدند($P<0/05$)ولی تاثیر معنی داری بر قابلیت هضم آهن وروی نداشتند($P>0/05$). از نتایج حاصل چنین استنباط می شود که باکتری های حل کننده فسفات زمانی بیشترین تاثیر را بر عملکرد و قابلیت هضم فسفر و کلسیم دارند که در کل دوره پرورش به جیره غذایی افزوده شوند.

واژه های کلیدی: باکتری های حل کننده فسفات، قابلیت هضم، فسفر، کلسیم، جوجه گوشتی

The Effect of Phosphate solublizing Bacteria on Ca, P, Fe, Zn and Mn digestibility in Broiler Chicks

The aim of this study was investigation on the effect of phosphate solublizing bacteria in boiler diet on digestibility of some minerals in broiler chicks. In this experiment phosphate solublizing bacteria (PSB) that isolated with screening soil samples collected from various region of Iran used as mixed to diet. The experiment included 320 one-day old broilers from ROSS strain in 3 periods, starter (1-21d) grower (23-35 d) finisher (36-49 d). Birds were randomly allocated to 4 treatments, with 4 replicates of 20 birds. Treatments include T1.Negative Control (basal diet, with no added probiotic); T2 – Negative Control + Probiotic (in starter, grower and finisher); T3 – Negative Control + Probiotic (in starter and grower) and T4 – Negative Control + Probiotic (in starter). In 49 d 4 birds randomly choose from each treatment and allocated in metabolic cage for 11 days, include 7 days adaptation and 4 days for samples collection. Phosphorus was determined with spectrophotometer. Chromic oxide, Ca, Fe and Zn were determined with atomic absorption. Probiotic significantly increased phosphate and calcium digestibility (P<0/05). However, phosphate solublizing bacteria didn't have significant effect on Fe and Zn digestibility. These results strongly suggest that phosphate solublizing bacteria as a probiotic can improve phosphate and calcium digestibility in broiler. However, more studies are needed to support this hypothesis.

Key words**:** Phosphate solublizing bacteria, Digestibility, Phosphate, Calcium, Broiler

شناسه :OH30

بررسی اثر پربیوتیک ایمونوژن بر شاخص های رشد بچه ماهیان قره برون (*Acipenser persicus*)

جافر نوده ،علی[1*] – سوداگر ،محمد [1 **]– اصلان پرویز ،حسن و حیدری، مرضیه [247] Sudagar_m@yahoo.com

1، 2و 3 –دانشکده شیلا – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

4– مرکز تحقیقات هسته ای کشاورزی –کرج

آبزی پروری یکی از بخش های در حال توسعه سریع ترین رشد در جهان و آسیا در حال حاضر سهم در حدود 90 ٪ از تولیدات جهانی را به خود اختصاص داده است. با وجود مزایای ارزشمند استفاده از این مواد درسلامت و عملکرد این مواد در حیوانات مختلف ، استفاده از prebiotics در پرورش ماهیان کمتر مورد بررسی قرار گرفته است.

بمنظور بررسی تاثیرپربیوتیک ایمونوژن بر فاکتورهای رشد بچه ماهیان قره برون (*Acipenser persicus*) ، آزمایشی بمدت 8 هفته در مرکز تحقیقات آبزی پروری دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت .برای اینکار ایمونوژن به جیره غذایی بچه ماهیان قره برون در سه سطح0 (تیمار شاهد)، 0/5 ، 1 و 2 گرم بر کیلوگرم اضافه گردید. و برای هر تیمار 3 تکرار در نظر گرفته شد..آزمایش درون مخازن پلی اتیلن 500 لیتری که با حدود 200 لیتر آب پر شده بود، انجام گرفت .تعداد 15 قطعه بچه ماهی قره برون (متوسط وزن0/47 ±27/01 گرم) درون مخازن ذخیره سازی و روزانه در4 وعده و به میزان 3 درصد زیتوده تغذیه شدند.در پایان دوره آزمایش فاکتورهای رشد مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان دادکه بهترین شاخص های رشد شامل افزایش وزن ، در صد افزایش وزن ، ضریب رشد ویژه(SGR) ، ،فاکتور وضعیت (CF) ، رشد روزانه، ضریب تبدیل غذایی(FCR)و شاخص قیمت در تیمار3(استفاده از 1 گرم بر کیلوگرم پربیوتیک اپتیمون) بچه ماهیان قره برون نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید($P < 0/05$).

لغات کلیدی : پربیوتیک، ایمونوژن ، تغذیه ، فراسنجه های رشد، قره برون

The effects of prebiotic Immunogen on the growth performance and Feed Conversion Ration of *Acipenser persicus*

Jafar Nodek,A[1*]. Sudagar,M[1]. AslanParviz,H[1]. Heidari,M[2] Sudagar_m@yahoo.com**

1-Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Fisheries Faculty, P.O. Box-386.Gorgan.Iran

2- Nucleic Research Center of Agriculture-Karaj

Aquaculture is one of the fastest developing growth sectors in the world and Asia presently contributes about 90% to the global production. Despite the potentials benefits to health and performance as noted in various terrestrial animals. The use of prebiotics in the farming of fish and shellfish has been less investigation.

The effects of prebiotic Immunogen on the growth performance, feed conversion Ration and Survival of *Acipenser persicus* were evaluated in 60 –day study. The experiment was conducted using *Acienser persicus* juvenile at the aquaculture Research Center of the Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Three different dietary levels of Immunogen (0, 0.5,1 and 2grkg^{-1}) were taken into account. The trial was carried out in 500 liters PVC tanks which were filled with about 200 liters of water.15 juvenile beluga (with average weight 27.01 ± 0.47 g) were stocked in tanks and were fed up 4 meals a day. Growth and survival factors were analyzed at the end of trial period. The

results showed that the addition of extracts in diets led to more improvement of body weight increase, weight increase percentage, specific growth rate (SGR), Daily Growth Rate (DGR), Daily Growth Index (DGI), Condition Factor (CF), price index (PI) and decrease of Food Conversion Ratio (FCR) than witness treatment. The best values of improvement of growth index were achieved at dietary level 1grkg^{-1} prebiotics of Immunogen.

Key words:Prebiotic, Immunogen, Nutrition, Growth Factors

شناسه: PH31

مقایسه اثر افزودن پروبیوتیک و پری بیوتیک به عنوان محرک رشد به جیره غذایی بر عملکرد و پاسخ ایمنی هومورال در جوجه های گوشتی

نیما سالیانهٔ* ، محمدرضا شیرزاد 2

مدیر علمی دفتر نمایندگی صنایع بیولوژیک VI-COR - تهران– ایران

دانشجوی دکتری تخصصی بیماری های طیور – دانشگاه شیراز – ایران

مطالعه اثرات ناشی از بکارگیری 2 نوع ترکیب محرک رشد مختلف بر روی بازده تولیدی و سطح عیار پادتن سرمی جوجه های گوشتی.

طرح: طرح آماری کاملا تصادفی

حیوانات: 360 قطعه جوجه یکروزه گوشتی از سویه تجاری راس 308

استفاده از سه گروه درمانی و تغذیه آنها به ترتیب با جیره غذایی فاقد هر گونه ترکیب محرک رشد، جیره غذایی حاوی 0/9 g/Kg و 0/45 پروبیوتیک پری مالاک تهیه شده از مخلوط کشت چهار باکتری:

Entrococcus Faecium, Bifido bacterium bifidium, lactobacillus casei , Lactobacillus acidiphilus

وجیره غذایی واجد 3 g/Kg پری بیوتیک ای– مکس تهیه شده از عصاره فراورده ای تخمیری تولید شده و دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه. در طول آزمایش، محاسبه وزن بدن، مقدار غذای مصرفی و ضریب تبدیل غذایی در سنین 35،28،21،14،7 و 42 روزگی. همچنین طی دوره پرورش جوجه ها سه نوبت بر علیه گامبرو و دو نوبت برعلیه نیوکاسل واکسینه شدند و عیار سرمی پادتن ضد گامبرو و نیوکاسل ابتدا در یک روزگی و سپس یک روز پیش از هر نوبت واکسیناسیون و در نهایت در چهل و دو روزگی به ترتیب توسط روش الایزا و هماگلوتیناسیون ممانعتی تعیین گردید.

استفاده از آزمون T استودنت و آنووا جهت تعیین اثر افزودن ترکیبات مورد آزمایش به جیره غذایی و آزمون توکی برای پی بردن اختلاف بین گروه های درمانی.

در مقایسه با گروه شاهد، افزودن پری بیوتیک به جیره غذایی، به طور معنی داری موجب افزایش وزن بدن جوجه ها در سنین 28 و 42 روزگی گردید ($P<0/05$). در حالی که افزودن پروبیوتیک به خوراک تاثیر معنی داری بر وزن بدن نداشت. استفاده از پری بیوتیک یا پروبیوتیک در جیره غذایی موجب کاهش ضریب تبدیل غذایی در مقایسه با گروه شاهد در پایان آزمایش گردید ($P<0/05$). اما اختلاف میان ضریب تبدیل غذایی در این دو گروه تنها در سن 42 روزگی بین گروه مصرف کننده پری بیوتیک و شاهد معنی دار بود. استفاده از پری بیوتیک در جیره موجب افزایش در سطح پادتن سرمی ضد نیوکاسل در مقایسه با گروه شاهد و گروه تغذیه شده بوسیله پروبیوتیک گردید. ولی تفاوت بین سطح پادتن سرمی ضد نیوکاسل در جوجه های تغذیه شده با پری بیوتیک نسبت به دو گروه دیگر، معنی دار نبود ($P>0/05$). در پایان آزمایش تفاوت بین سطح عیار پاد تن سرمی ضد گامبرو در جوجه های تغذیه شده با پری بیوتیک یا پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد، معنی دار نبود ($P>0/05$).هر چند گروه درمانی تغذیه شده با پری بیوتیک دارای میانگین تیتر بالاتر و درصد یکنواختی تیتر (CV%) مطلوب تری نسبت به دو گروه دیگر بوده است.

بر اساس نتایج حاصله می توان چنین نتیجه گیری نمود که افزودن هر یک از دو ترکیب پروبیوتیک یا پری بیوتیک مورد استفاده در این بررسی تجربی به جیره غذایی، سبب بهبود بازده تولید در جوجه های گوشتی در مقایسه با گروه شاهد گردید. از سوی دیگر بدلیل برتری نسبی بکارگیری پری بیوتیک نسبت به پروبیوتیک در این آزمایش، بدلیل وجود اختلاف آماری معنی دار بین نتایج حاصل از افزودن این دو ترکیب به جیره غذایی، به نظر می رسد استفاده از پری بیوتیک تهیه شده از عصاره سلولی و فراورده های تخمیری مخمر ساکارومایسس سرویزیه به عنوان محرک رشد می تواند قابل توصیه باشد.

واژه های کلیدی: جوجه گوشتی،پروبیوتیک،پری بیوتیک،وزن بدن،ضریب تبدیل غذایی،پادتن سرمی،گامبرو، نیوکاسل.

PERFORMANCE AND ANTIBODY RESPONSE OFBROILERCHICKENS FED DIETS CONTAINING PROBIOTIC AND PREBIOTIC

SALIANEH .N[1], SHIRZAD.M.R

1- Research manager of Vi-cor's Agancy, Iran

2- Ph.D. Student in avian department research center

University, Shiraz, Iran

Our investigations were conducted in order to determine the Influence of Yeast Culture based prebiotics and Lactobacillus based probiotic culture on the performance and immune response of Ross broiler chickens. Total of 360 male chicks were included in the study which lasted 42 days. They were in a completely randomized design test in 3 groups with 4 replicates. Birds were fed ad libitum two different complete food mixtures (from days 1- 21 and 22-42). First group (control) received corn-soybean meal based diet. Mixtures for chickens from the second group were supplemented with 3g/kg yeast culture based prebiotics and the birds from third group were fed by 0.9, 0.45 g/kg Lactobacillus based probiotic culture.

Body weight gain, food consumption and feed conservation ratio at the age of first to 6^{th} week were evaluated. IBD and NCD antibody titer at first day and one day before any vaccination and finally at the age of day 42 were measured.

Analyzed results and compared means by ANOVA, TUKEY tests showed chickens body weight significantly increased by supplementation of prebiotic ($p<0.05$) at the age of 28, 42 days, but no significant effect was seen in the probiotic and control groups. Feed/gain was significantly improved with Prebiotic treatment group ($p<0.05$) at the age of 42 days compared to control and probiotic trratment. Supplementation of both prebiotic and probiotic in the diet increased anti NCD antibody titer in chicks, but the increase was not significant; however chickens on prebiotic treatment showed a higher antibody titer than other two treatments. Similarly mean titer of anti-IBD antibody was higher in prebiotic fed group, but the difference was not significant. A comparision of the Coefficients of Variation (%CV) on IBD titers showed that there was more uniformity in prebiotic group and lower %CV as compared to control and probiotic groups.

Key words:

Broiler chicken, Probiotic, Prebiotic, Body weight, Antibody response.

شناسه: OH32

اثرات الیگوفروکتوز بر باکتری های پروبیوتیکی بومی روده بچه فیل ماهی (*Huso huso*).

سید حسین حسینی فر[1*]، علیرضا میرواقفی[2]، باقرمجازی امیری[2]، کاظم درویش بسطامی[3]، مریم مردانه خاتونی[2]**

1*** عضو باشگاه پژوهشگران جوان، واحد ورامین

2 پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه شیلات و محیط زیست

مرکز ملی اقیانوس شناسی

در این مطالعه اثرات افزودن سطوح مختلف پربیوتیک الیگوفروکتوز به جیره بر باکتری های پروبیوتیکی بومی روده بررسی شد. بچه ماهی با میانگین وزنی 20 گرم به طور تصادفی در واحد های آزمایش رهاسازی شده و پس طی دوره آداپتاسیون با جیره های حاوی سطوح 1، 2 و 3 درصد پربیوتیک مذکور تغذیه شدند. تغذیه بچه ماهی ها با جیره های آزمایشی به مدت 7 هفته صورت پذیرفت. در پایان دوره بررسی تعداد کل باکتری های و همچنین تعداد باکتری های پربیوتیکی (جنس لاکتوباسیلوس) بومی روده به ترتیب از طریق کشت بر روی محیط های کشت MRS آگار و پلیت کانت آگار (PCA) انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که لاکتوباسیلوس های پربیوتیکی در تیمار 2٪ الیگوفروکتوز بیشترین افزایش را داشتند. با این حال تعداد لاکتوباسیلوس ها در تیمار 3٪ کاهش معنی داری نسبت به تیمار شاهد داشت. کاهش تعداد لاکتوباسیلوس ها احتمالا در نتیجه عدم توانایی لاکتوباسیلوس ها در تخمیر مقادیر بالایی الیگوفروکتوز در جیره و تجمع آن در روده می باشد. با توجه به نتایج بدست آمده سطح بهینه افزودن پربیوتیک الیگوفوکتوز به جیره بچه فیل ماهی جهت افزایش تعداد لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی سطح 2 ٪ می باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، مخمر، روده، فیل ماهی

The study of possible increase of probiotic bacteria in intestinal microbiota of beluga juveniles (*Huso huso*) using inactive yeast cells

Seyed Hossein Hoseinifar*[1], Alireza Mirvaghefi[2], Bagher Mojazi Amiri[2], Kazem DarvishBastami[3], Maryam Mardaneh Khatooni[2]**

hoseinifar@ut.ac.ir

1*** member of Young Researchers center, Varamin-Pishva branch

2 Department of Fisheries & Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources, University of Tehran

3 Iranian National Center for Oceanography, Tehran, Iran

This study investigates the effects of dietary oligofructose on indigenous probiotic bacteria of beluga juveniles (*Huso huso*) intestinal microbiota. Juveniles (average weight 20g) were randomly allocated to experimental units and after adaptation, fed with diets containing varying levels of oligofructose (0%, 1%, 2% and 3%). Fish were fed the experimental diets for 7 weeks. At the end of trial, Lactic Acid Bacteria (LAB) and total bacteria in intestinal microflora of beluga juveniles were determined by culturing on Plate Count Agar (PCA) and MRS Agar media, respectively. The results showed that LAB levels significantly increased in 2% oligofructose treatments compare other treatments. However, LAB levels were significantly lower in 3% treatment compare control. Adverse effect of 3% dietary oligofructose on LAB levels is possibly due to inability

of indigenous LAB to ferment higher level of prebiotic and accumulation of oligofructose in intestine. According to these results 2% dietary oligofructose is the optimum level for elevation of LAB levels in intestinal microbiota.

Keywords: probiotic, Lactobacillus, yeast, intestine, beluga

شناسه: OH33

تولید ماست پروبیوتیکی با زمان ماندگاری طولانی با استفاده از یک آغازگر جدید

شیرزاد، مهدیه* ، توانگر،حمیدرضا، ، هاشمی نسب، سید محمد، مدرسی، سید محمدحسین**

کارشناس ارشد میکروبیولوژی1، 49mahdiehshirzad@gmail.com ، پزشک، پزشک3، دانشیار2،

[1] شرکت تک ژن زیست، شرکت تک ژن زیست، [2] گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، [3]دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

در این اختراع با توجه به بررسی‌های گسترده‌ای که بر روی ماست‌های محلی شمال ایران انجام گرفت، یکی از سویه‌ها به نام لاکتوباسیلوس پارا کازئی زیرگونه پاراکازئی به عنوان سویه آغازگر انتخاب شد. این لاکتوباسیل بیشترین قدرت تحمل اسیدیته پایین و نمکهای صفراوی را داشت، قادر به تولید پلی ساکارید خارج سلولی و واجد فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی بود. این سویه برای اولین بار به جهت تولید یک ماست پروبیوتیکی جدید با ویژگی های خاص مورد استفاده قرار گرفت. پس از تولید بیومس آن به شیر 1.5% چربی واجد 1-5% پودر شیر خشک افزوده شد و در دمای 40-42 °c به مدت 16 ساعت گرماگذاری شد. ماست تهیه شده از این سویه دارای ارزش پروبیوتیکی بالایی بوده و حتی بعد از 3 ماه نیز ترش نمی‌شود (حتی در دمای اتاق). تعداد باکتری های زنده در این ماست پروبیوتیکی پس از گذشت یک ماه 10^6 cfu/ml و pH آن 4/6 باقی می ماند. بدین ترتیب این سویه می تواند دو مشکل اصلی ماست های پروبیوتیکی که ترش شدن آنها و کاهش سلول های زنده می باشد را برطرف سازد. این ماست پروبیوتیکی باعث بهبود میکروفلور روده، کمک به هضم و جذب غذا، کاهش کلسترول و LDL خون، جلوگیری از رشد میکروبهای بیماریزا در روده و افرایش قدرت سیستم ایمنی می‌گردد.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، ماست، آغازگر، ماندگاری طولانی

Production of Probiotic Yogurt with Extended Shelf Life Using A New Starter

Shirzad, Mahdieh[*1], Tavangar[1] Hamid Reza, , Hasheminasab, S.Mohammad[3], and Modarressi, S.Mohammad Hossein[*2]**
1 TAKGENE Co., 2 Tehran University, Medical Genetic Department, 3 Tehran University, Medical Science Department.

Microbiologist (MSc), mahdiehshirzad@gmail.com, , Medicine, hamidtavangar@gmail.com, Medicine, sm.hashemin@gmail.com, Associate Professor, modaresi@sina.tums.ac.ir

In this invention, after screening some local yogurts from north of Iran, Lactobacillus Paracasei sub. Paracasei was selected as a starter culture. This Lactobacillus has excellent probiotic properties such as maximum tolerance of low pH, resistance against bile salts, production of extracellular polysaccharide (EPS) and the ability to hydrolyze bile salts. This species has been used for the first time to produce a novel probiotic yogurt with special features.

After the production of the biomass, it was washed with normal saline, and was added to 1.5% fat milk containing 1-5% milk powder and was incubated at 40-42 °C for 16 hours. The yogurt has a high probiotic value and does not turn sour after 3 months (even at room temperature). The number of viable cells in this yogurt during a month of storage stayed 10^6 cfu/ml. It did not have any post acidification, that is, pH remained 4.6. In conclusion, this strain could overcome two main problems of probiotic yogurt: post acidification and a decrease in viable cell count.

According to in vitro studies, this starter may improve the gut microflora, help digestion and absorption of food, reduce cholesterol (LDL), prevent the growth of pathogen bacteria and enhance immune system. We would like to recommend clinical studies to evaluate these potential qualities.

Key words: Probiotic, Yogurt, Starter, Shelf life.

شناسه: OH34

بررسی شرایط تولید نیسین از لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان یک پروبیوتیک

تفرشی، سید حسام الدین[*1]؛ میردامادی، سید سعید[2]؛ نوروزیان، داریوش[3]؛ خاتمی، شهره[4]؛ سرداری، سروش[5]**

[1]دانشجوی دکترای بیوتکنولوژی، tafreshi@pasteur.ac.ir ؛ [2]عضو هیأت علمی، [3]عضو هیأت علمی

[4]عضو هیأت علمی، ؛ [5]عضو هیأت علمی،

[1]بخش محلول های تزریقی، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتوپاستورایران؛ [2]پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران؛[3]بخش واکسن های باکتریایی وآنتی ژن، مجتمع تولیدی و تحقیقاتی انستیتوپاستورایران؛

[4]بخش بیو شیمی، ا نستیتو پاستور ایران؛ [5] بخش بیوتکنولوژی، ا نستیتو پاستور ایران

باکتریوسین ها یی که از باکتری های اسید لاکتیک تولید می شوند به عنوان نگهدارنده های طبیعی یا بیولوژیک باید دارای ویژگی های زیر باشند: پایداری در طول نگهداری و فرآیند تولید، کارایی در غلظت کم، توجیه اقتصادی و نداشتن تأثیر نامطلوب روی فرآورده. نیسین که توسط سویه های خاصی از لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می شود و بر علیه طیف وسیعی از باکتری های گرم مثبت شامل استرپتوکوک ها، استافیلوکوک ها، لاکتوباسیل ها، میکروکوک ها، لیستریا و گونه های کلاستریدیوم و باسیلوس مؤثر است و به عنوان یک نگدارنده طبیعی سالم و بیخطر در بیش از 50 کشور دنیا شناخته شده است.

برای تولید نیسین درک تأثیر عوامل غذایی و غیر غذایی بر سویه امری ضروری است. به همین منظور و برای ارزیابی اثر این عوامل، یک مطالعه در مقیاس آزمایشگاهی انجام شد. سویه تولید کننده نیسین، لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس ATCC 11454 و از میکروکوکوس لوتئوس ATCC 10240 به عنوان سویه حساس به نیسین برای اندازه گیری بیولوژیک (bioassay) آن استفاده گردید.

مطالعه نشان داد محیط کشت MRS در شرایط یکسان به طور تقریبی دو برابر توان تولید نیسین را نسبت به محیط کشت M17 دارد. حجم و عمر تلقیح، pH محیط کشت، دما، نسبت حجم ظرف به حجم محیط کشت و دور هم زن ابتدا به صورت بررسی تغییر هر عامل در یک زمان (one factor at a time) و سپس با طراحی آزمایش بر پایه مدل های نرم افزاری آماری با استفاده از روش آرایه های مستطیلی (Orthogonal array) در تولید ناپیوسته بهینه سازی شدند. در شرایط بهینه، میزان تولید نیسین 599/70 IU/ml و میزان تولید به ازای واحد زمان 37/48 IU/ml/h بود. بدین ترتیب محیط کشت و شرایط مناسب فرمانتاسیون برای لاکتوکوکوس لاکتیس به عنوان بهترین سویه تولید کننده نگهدارنده بیولوژیک (نیسین) برای استفاده در صنایع لبنی بهینه سازی شد.

کلید واژه ها: تولید نیسین، لاکتوکوکوس لاکتیس، بهینه سازی، عوامل غیر غذایی، تولید ناپیوسته

Study of fermentation conditions on nisin production by

***Lactococcus lactis*, as a probiotic**

Tafreshi, Say-yed Hesameddin[1*], Mirdamadi, Saeed[2], Norouzian, Dariush[3], Khatami, Shohreh[4], Sardari, Soroush[5]**

[1]Ph. D student, tafreshi@pasteur.ac.ir; [2]Mirdamadi@irost.ir; [3]dnsa@pasteur.ac.ir; [4]sh-khatami@pasteur.ac.ir; [5]ssardari@hotmail.com

[1]Injection Solutions Department, Research and Production Complex, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; [2]Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran; [3] Bacterial Vaccines & Antigens Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; [4]Biochemistry Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; [5]Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Bacteriocins produced by LAB, which is considered as natural preservatives or biopreservatives fulfill following criteria: stability to processing and storage, efficacy at low concentration, economic viability, no deleterious effect on the food. Nisin, a bacteriocin produced by certain strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, is inhibitory to a wide range of Gram-positive bacteria, including strains or species of *Streptococci, Staphylococci, Lactobacilli, Micrococci, Listeria* and most spore-forming species of *Clostridium* and *Bacillus*. It is currently recognized as a safe food preservative in approximately 50 countries.

When attempting to improve production of nisin, understanding the effect of nutritional and nonnutritional factors is essential owing to a lack of adequate information about these factors among various investigations. In order to assess some of nonnutritional factors and how they influence the nisin production in batch cultivation, a laboratory scale study was performed. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 produced nisin and *Micrococcus luteus* ATCC 10240 was used in bioassay measurement as the nisin-sensitive strain.

At first, growth of *Lactococcus lactis* and production of nisin in two standard media was studied. In comparison to M17 medium, our study showed that nisin production approximately was two fold in MRS medium. The age and size of inoculum, initial pH value of the medium and flask volume/medium volume (F/M) ratio, temperature as well as agitation were studied at first by changing one factor at a time and then using orthogonal array method in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium. In the present study statistically-based experimental design was applied for the optimization of nisin production as a standard fermentation conditions for nisin production. Under the optimized conditions, maximum nisin production and maximum nisin productivity were 599.70 IU/ml and 37.48 IU/ml/h respectively. The validity of the optimum conditions was verified by a separate experiment. So, suitable medium and fermentation conditions were optimized for *Lactococcus lactis*, as the best producer of natural biopreservative (nisin) for use as a probiotic in dairy industries.

Key words: Nisin, Lactococcus lactis, optimization, non-nutritional factors, batch fermentation

شناسه :OH35

امکان سنجی تولید بهینه بیوپلیمر فراویژه کفیران از آب پنیر با استفاده روش سطح پاسخ

قاسملو مهران **[1]خدائیان فرامرز[2]مویدی علی[1]غریب زاهدی سیدمحمد تقی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران، دانشکده فناوری و مهندسی کشاورزی، کرج

استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران، دانشکده فناوری و مهندسی کشاورزی، کرج

دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشگاه تهران، دانشکده فناوری و مهندسی کشاورزی، کرج

ترکیبات خوراکی فراویژه نظیر کفیران اهمیت بسزایی درسلامت انسان دارند. این ترکیب توسط باکتری لاکتوباسیلوس کفیرانوفاسینس در دانک کفیر (استارتر کفیر) تولید می‌شود. مطالعات زیادی به منظور اپتیمم سازی شرایط تولید این مواد از میکروارگانیزم‌ها با روش سطح پاسخ انجام شده‌است. این تحقیق در این راستا است و نتایج آن نشان داد که می توان از ضایعات صنایع لبنی مانند آب پنیر برای تولید کفیران استفاده‌کرد. مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت سیگما و مرک خریداری شدند. آب پنیر از شرکت فرآورده های لبنی سحر خریداری شد و به همراه عصاره‌ی مخمر (طبق طرح مرکب مرکزی) به عنوان محیط کشت استفاده‌شد. دانه های کفیر بعنوان استارتر کشت از مصرف کننده ای خانگی در تهران تهیه گردید. مقدار کفیران استخراجی با استفاده از روش رنگ سنجی و دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری گردید. در این تحقیق، ابتدا، از میان چند منبع مختلف نیتروژنی، عصاره مخمر به عنوان مناسب‌ترین منبع موثر بر تولید کفیران با استفاده از طرح "یک فاکتور در یک زمان" تشخیص داده شد. سپس اثر چهار فاکتور غلظت لاکتوز آب پنیر، غلظت عصاره مخمر، دما و pH در پنج سطح بر تولید کفیران در دانک کفیر با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی بهینه سازی گردید. نتایج بدست آمده از آنالیز رگرسیون درجه دوم، نشان داد که مناسب‌ترین شرایط برای تولید کفیران غلظت لاکتوز 66/63 g/l، عصاره مخمر 12/26g/l، دمای 24/13°C و pH =5/62 است. تحت این شرایط میزان کفیران تولیدی 677 mg/l پیش‌بینی شد. آزمایشات تاییدی ضمن تصدیق پیش‌بینی مدل نشان دادند که در شرایط بهینه میزان تولید کفیران در دانک 663±25 mg/l است.

واژگان کلیدی: کفیران، بهینه سازی، آب پنیر، خواص فراویژه، روش سطح پاسخ

Possibility of optimum production of functional kefiran from cheese-whey by response surface methodology

Ghasemlou Mehran **Khodaiyan FaramarzMoayyedi Ali, Gharibzahedi Seyed Mohammad Taghi

Department of Food Science, Engineering and Technology, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, P.O. Box 4111, Karaj 31587-77871, Iran.

Functional compounds like kefiran play important role in human health. Thus, many studies have carried out for determination the optimum conditions the production of these compounds from microorganisms using response surface methodology. The results of this research showed that the waste of dairy industrial such as whey can be used to produce kefiran.

Kefiran exopolysaccharide is a compound which has high pharmaceutical and antimicrobial properties. It produces mainly by *Lactobacillus kefiranofaciens* in kefir grain. Chemical agents were purchased from Sigma and Merck. Cheese whey was obtained from Sahar Company (Ghazvin) and supplemented with yeast extract (according to central composite design (CCD)) as culture media. Kefir grains obtained from household consumer as starter culture. The amount of kefiran was measured by colorimetric procedure. **Results of second regression analysis** showed that optimum conditions to obtain maximum kefiran were found to be: whey lactose concentration of 66.63 g/l; yeast extract concentration of 12.62 g/l; pH of 5.7 and temperature of 24.13°C. The predicted Kefiran production was 667 mg/l which under these conditions was 663±25 mg/l. The result of verified experiment showed that the proposed model can predict extensively effect of four independent variables for production of this polymer

Keywords: Kefiran, Optimization, Functional properties, Cheese whey, Response surface methodology

شناسه: PH36

تکنولوژی تولید بستنی پروبیوتیک

همایونی‌راد عزیز*،، جوادی مینا**

گروه علوم و صنایع غذایی- دانشکده بهداشت و تغذیه- دانشگاه علوم پزشکی تبریز

بستنی پروبیوتیک، بستنی حاوی سلول‌های میکروبی زنده پروبیوتیک است که از قابلیت خوبی برای توزیع پروبیوتیک‌ها در میان مصرف‌کنندگان برخوردار است. در بین محصولات لبنی منجمد پروبیوتیکی، بستنی به دلیل داشتن پ‌هاش خنثی (7) بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. به طوری که پ‌هاش بستنی غیر تخمیری در حدود هفت بوده و این عامل، امکان زنده‌مانی هر چه بیشتر باکتری‌های پروبیوتیک را فراهم می‌آورد. در واقع میزان ماده خشک بالای بستنی، اثر محافظتی خوبی بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک دارد. برای فرمولاسیون بستنی پروبیوتیک، می‌توان از شیر پس‌چرخ، خامه سنگین (40٪ چربی)، شیر خشک، شکر، پایدارکننده و امولسیون‌کننده، طعم‌دهنده (وانیلین) و نشاسته مقاوم استفاده کرد. در ابتدا شیر و خامه وارد تانک فرمولاسیون شده و به آرامی حرارت داده می‌شود. وقتی که دما به 50 درجه سانتیگراد رسید، شیر خشک بدون چربی و نشاسته مقاوم با نصف شکر به آن اضافه می‌گردد و در حالی که هم‌زن دستگاه کار می‌کند، مواد طعم دهنده افزوده می‌شود. سپس مخلوط بستنی در یک هموژنایزر دو مرحله‌ای به ترتیب در فشار 3000 و 500 پ‌اس‌آر هموژن (همگن) شده و تا دمای چهار درجه سانتیگراد خنک گردیده و به مدت 12 ساعت در این دما نگهداری می‌شود تا فرآیند رسیدن مخلوط انجام پذیرد. پس از آن یک درصد از سلول‌های پروبیوتیک به بستنی پروبیوتیک غیر تخمیری اضافه شده و بلافاصله پس از افزودن پروبیوتیک‌ها در دستگاه فریزر منجمد گردیده و پس از بسته‌بندی در لیوان‌ها به سردخانه 20- درجه سانتیگراد منتقل می‌شوند.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، بستنی، تکنولوژی.

Technology of probiotic ice cream manufacturing

Homayouni Rad, Aziz*، **, Javadi, Mina

Department of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences.
Homayounia@tbzmed.ac.ir

Ice cream is an ideal vehicle of delivery of probiotics in the human diet. The pH of non-fermented ice-cream is closer to 7 and this neutral pH provides possibility for satisfactory survival of probiotic bacteria in the ice cream. The high total solids level in ice cream including the fat and milk solids presents protection for the probiotic bacteria. In this investigation the below formulation was used for manufacturing the probiotic ice cream. The milk and cream (40% fat) were mixed and temperature was increased to 50°C; the blend of skim milk powder, resistant starch and stabilizer along with sugar were added. The resultant mixture was flavored with vanillin and homogenized in a two-stage homogenizer at 3000 and 500 psi and then pasteurized at 80°C for 20s and after pasteurization, the mixture was cooled to 4°C and stored for 12h for ripening at this temperature. 1% (w/v) of probiotic culture was added to ice cream mix immediately before freezing. The partially frozen mixture was packaged in cups and stored at -20°C.

Key words: probiotic, ice cream, technology.

شناسه: OH37

تاثیر نوع بسته بندی بر زنده مانی باکتریهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدیو باکتریوم لاکتیس در دوغ سنتی ایرانی

دینی علی* [1] ، رضوی سید هادی [2] ، ابراهیم زاده موسوی سید محمد علی [3]، روحبخش علی [4]**

1تهران، کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، فارغ التحصیل کارشناسی ارشد

2تهران، کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، استادیار،

3تهران، کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، دانشکده مهندسی بیوسیستم کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشیار،

4رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان،گروه فیزیولوژی فارماکولوژی ، استادیار،

دوغ محصولی است که از سالیان دراز در ایران و کشورهای همجوار بطور گسترده مصرف می شود بطوریکه دوغ را می توان محصول لبنی سنتی ایران نامید. تولید دوغ پروبیوتیک می تواند اثرات سلامت بخش این باکتریها را از طریق محصولی سنتی به جامعه منتقل نماید در محصولات پروبیوتیک میزان باکتریهای زنده هنگام مصرف از اهمیت بسزایی برخوردار است نوع بسته بندی بکار رفته در محصول تولید شده بواسطه عبور گازها بالاخص اکسیژن به داخل بسته می تواند بطور غیر مستقیم بر زنده مانی باکتریهای اسید لاکتیک تاثیر بگذارد . در این تحقیق از چهار نوع بسته بندی لیوانهای پلی اتیلنی دانسیته پائین ، پلی استایرنی، پلی اتیلن ترفتالات (PET) و شیشه استفاده شد . مشاهده گردید که تفاوت معنی داری در سطح 5 درصد ی در زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بین بسته بندیهای بکاررفته مشاهده نشد این در حالی بود که استفاده از لیوان پلی اتیلنی و پلی استایرنی جهت نگهداری دوغ پروبیوتیک بطور معنی داری در سطح 5 درصد میزان زنده مانی کمتر بیفیدوباکتریوم لاکتیس را در مدت 21 روز نگهداری در مقایسه با بسته بتدیهای PET و شیشه از خود نشان دادند. اما نوع بسته بندی تاثیر معنی داری بر زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نداشت.

کلید واژگان: دوغ پروبیوتیک، پتانسیل احیاء ، ، بیفیدیوباکتریوم لاکتیس، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، بسته بندی.

The effect of type of packaging on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in iranian acidy dairy drink (doogh)

Ali Dini *[1], Seyed hadiye razavi[2], Seyed Mohammad Mousavi **[3], Ali Roohbakhsh [4]

1Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Biosystem Engineering, Agricultural Campus, University of Tehran, Karaj, M.sc student, ali_diny@yahoo.com,

2Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Biosystem Engineering, Agricultural Campus, University of Tehran, Karaj, Assiatant professor, srazavi@ut.ac.ir

3Department of Food science, engineering and Technology, Faculty of Biosystem Engineering, Agricultural Campus, University of Tehran, Karaj, Associate professor, mousavi@ut.ac.ir,

4Department of physiology & pharmacology school of Medicine, Rafsanjan university of medical sciences, Assiatant professor, aroohbakhsh@rums.ac.ir,

Doogh has been widely consumed in Iran and neighbor countries for a long time as the traditional Iranian dairy product. Manufacture of probiotic acidy dairy drink (doogh) would transfer the health-promoting affects of these bacteria to the society. Viability of bacteria upon consumption is so important in probiotc products. Packaging material could indirectly influence the viability of probiotc bacteria through permeation of various gases into product especially oxygen which effects the redox potential.

In the current study four types of packaging materlais, low density polyethylene, polystyrene, polythelene terfetalate (PET) and glass were used. There was no significant differecne at 5% significance level in the viability of *Lactobacillus acidophilus* in all the packaging materials. Polyethelene and polystyrene would however showed a lower rate of viability for *Bifidobacterium lactis* than PET and glass.

Keywords: Probiotic doogh, redox potential, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis, Packaging.

شناسه: OH38

بهینه سازی فرآیند خشک کردن پاششی *Bifidobacterium bifidum*

*** 1 ارجمند مهدی -2 فاضلی محمدرضا -1 شکری زهرا1**

1 -(مهندسی شیمی - دانشگاه آزاد اسلامی)واحد تهران جنوب zahrashokri@yahoo.com

2آزمایشگاه تحقیقات پروبیوتیک، گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

فرآیند خشک کردن پاششی محصولات پروبیوتیک به منظور تولید پودری با کیفیت مطلوب و محتوی مقادیر بالایی از باکتری های پروبیوتیک به کار می رود . .هر چند دماهای بالا باعث کاهش رطوبت محصول و در نتیجه پایدا ری و ماندگاری بیشتر آن خواهند شد، اما از طرفی این امر به کاهش درصد زنده ماندن باکتری ها نیز منجر می شود .هدف از این تحقیق، تعیین شرایط بهینه ای برای فرآیند خشک کردن پاششی سوسپانسیون است ***Bifidobacterium bifidum*** .

بهینه سازی با استفاده از نرم افزار**7.0.0** Design Expert (DX) Software (State-Ease Inc., version و با به کارگیری روش Central composite design و با در نظر گرفتن سه فاکتور دمای هوای ورودی، فشار هوا و مقدار مالتودکسترین مورد استفاده در سوسپانسیون به عنوان پارامترهای اصلی، همچنین درصد زنده ماندن و رطوبت پودر حاصله به عنوان ***B.bifidum*** پاسخهای موردنظر انجام پذیرفت.

از نقطه نظر آماری، در شرایط بهینه برای رسیدن به حداکثر درصد زنده ماندن و حداقل مقدار رطوبت در پودر محصول، مقادیر فاکتورهای اصلی به صورت زیر گزارش شدند:

ورودي هواي دماي = C هوا فشار ؛ ◦103/15 = bar مالتودکسترین مقدار ؛ 4/00 = 15/00gr.

کلمات کلیدی :خشک کردن پاششی، بهینه سازی ،*Bifidobacterium bifidum*

شناسه : OH39

تهیه اشکال دارویی جامد خوراکی از لاکتوباسیلوس کازیی GG با استفاده از روش اسپری درایینگ

بهمنی سحر [*1]، فاضلی محمد رضا [1]، صمدی نسرین [1]، جمالی فر حسین [1]، گیلانی کامبیز [2]، تولیت طیبه [2]

1-گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

2- گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تا کنون برای ساخت محصولات پروبیوتیک در دنیا از روش فریز درایینگ استفاده می شده است که علی رغم تایید کارایی آن ، پرهزینه وزمانبر است. هدف از انجام این تحقیق بهینه کردن شرایط خشک کردن و فرمولاسیون باکتری *Lactobacillus casei* GG می باشد که از پرمصرف ترین باکتری های پروبیوتیک به شمارمیرود. در این تحقیق از روش اسپری درایینگ برای خشک کردن این باکتری استفاده شد و نقش عوامل مختلفی از جمله متغیر های خود دستگاه ، ترکیبات محیط کشت باکتری ها و فیبرهای قندی محافظ بررسی گردید. .نقش منابع مختلف قندی و نیتروژنی در مراحل تخمیر باکتری بررسی گردید. برای مقاوم سازی باکتری ها از القای شوک حرارتی و اسموتیک به منظور بالا بردن توان مقاومت سلولها از طریق تولید heat shock proteins استفاده گردید. در هر مرحله نیز میزان آسیب های وارده به دیواره سلولی باکتری از طریق میزان حساسیت به NaCl 5% برآورد می شد. قدم بعدی فرموله کردن پودر حاصل به شکل قرص انتریک ریلیز بود که برای این منظور از نسبت های مختلف اودراژیت L100-55 وسپس پرس مستقیم در دستگاه پرس تک سنبه ای استفاده گردید. پلیمرهایی مانند HPMC, Cellulose acetate phthalate و Micro crystalline cellulose نیز بررسی شدند. یک نمونه از قرص های دو لایه با روکش تراکمی اودراژیت و هسته متیل سلولز و باکتری و نیز قرص های با روکش اکریلیز انتریک کوتد و هسته باکتری تهیه شدند. از پودر اسپری درای شده بدون مالتودکسترین نیز قرصهایی به روش گرانولاسیون و پرس مستقیم با اودراژیت تهیه گردید و پایداری، زمان انحلال وزمان باز شدن برای آنها محاسبه شد.

5٪ پلی ساکارید مالتودکسترین به همراه Permeate10٪ ، 2/5 ٪ yeast extract و 2/5٪sucrose برای محیط کشت باکتری در طی 3-2 ماه نگهداری پودر حاصل بهترین نتیجه را داشت. استفاده از دمای مرطوب 55 تا 75 درجه سانتیگراد و 4٪ نمک کلرور سدیم در افزایش پایداری از طریق تولید HSPها بهترین نتیجه را داشت. پلیمرHPMC, Cellulose acetate phthalate و Micro crystalline cellulose در آزمایشات پایداری و دیسولوشن در pH 6/8 فاقد اثرات مورد نظر بودند. قرص های تهیه شده از طریق روکش اکریلیز بهترین پایداری و خصوصیات مربوط به قرص ها را پس از 80 روز نگهداری در دمای 4^0C یخچال نشان دادند.در روش اسپری درایینگ استفاده از پلی ساکاریدهای محافظ در محیط کشت باکتری، القای تولید HSP در باکتری و فرمولاسیون انتریک ریلیز مناسب می توانند بیشترین اثرگذاری را در بقای باکتریها تا کلون داشته باشند.

کلمات کلیدی:لاکتوباسیلوس کازیی، اسپری درایینگ، HSPs، مالتودکسترین، روکش اکریلیز

شناسه: OH40

بررسی اثرات سوش لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدباکتریوم بر میزان کلونیزاسیون سالمونلا تیفی موریوم وتغییرات شاخص های خونی در موش رت نر

مهدی رهنما

استادیار گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم پایه و پزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان.meh_rahnema@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف :پرو بیوتیک ها کشت های خالص یا مخلوطی از میکروارگانیسم ها بوده که تاثیرات مفیدی بر روی میکروفلور های بومی روده انسان و جانوران دارند.آلودگی سالمونلایی به عنوان یکی از بزرگ ترین مشکلات سلامتی در جهان مطرح می باشد وشدت اسهال ناشی از سالمونلا تیفی موریوم وابسته به میزان کلونیزاسیونی این باکتری در روده کوچک است،استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها و عوامل ضد میکروبی موجب افزایش مقاومت عوامل عفونی به آنتی بیوتیک های رایج شده است ، به همین علت هدف از این پژوهش بررسی اثرات سوش لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدباکتریوم بر میزان کلونیزاسیون سالمونلا تیفی موریوم وتغییرات شاخص های خونی در موش رت نر می باشد.

مواد و روش کار: این مطالعه بر روی 5 گروه 5تایی موش نر انجام شده است .این گروه ها شامل گروه های دریافت کننده پروبیوتیک هم زمان با تزریق باکتری(گروه اول)، دریافت کننده باکتری و تیمار پروبیوتیک پس از آلودگی(گروه دوم)، دریافت کننده باکتری بدون درمان(گروه سوم) ، دریافت کننده پروبیوتیک(گروه چهارم) و گروه کنترل است.آلوده کردن موش ها با تلقیح یک میلی لیتر ($7/5\times10^5$ باکتری در میلی لیتر) سالمونلا تیفی موریوم با تزریق زیر جلدی در ناحیه گردن و تیماربا قرص های پروبیوتیک به صورت یک قرص برای هر موش در هر دفعه به مدت 14 روز (یک در میان) به صورت رکتالی انجام گرفت.پس از نمونه برداری خون و مدفوع در هر نوبت آزمایشات میکروبیولوژی و هماتولوژی برای برسی میزان کلونیزاسینو باکتری و تغییرات شاخص های خونی انجام شد.

نتایج:مقایسه میانگین های شمارش باکتری در نمونه مدفوع ها نشان داد که کاهش معنی داری ($p<0/05$)بین گروه های تجربی نسبت به کنترل وجود دارد.اثرات متقابل تاریخ های نمونه برداری در گروه های تجربی اختلاف معنی داری را بین تاثیر تیمار در کاهش شدت عفونت روده ای نشان داد.تعداد گلبول های سفید و پلاکت های خون در گروه چهارم نسبت به کنترل کاهش معنی داری را نشان داده ولی سایر شاخص های خونی (کلسترول، گلبول قرمز و غیرهٔ) و وزن کبد و کلیه موش های تحت تیمار با پروبیوتیک تغییری را نسبت به گروه کنترل نشان نداده است.

کلید واژه:پروبیوتیک،فعالیت ضد میکروبی،سالمنولا تیفی موریوم.

Stady effects of mulistrain *Lactobacillus acidophilus* and *Bifido bacteriumon* coloniziation of *Salmonella typhimurium* and blood factors variations in male Rats

M.Rahnema

Department of Biology,Faculty of sciences,Islamic Azad University,Zanjan-Branch. meh_rahnema@yahoo.com

Abstract

Introduction: Probiotics are single or mixed microorganisms which are used for human and animals and have positive effects on their host by improving the propersies of local microfloros. *Salmonella* infection is one of biggest problems in different parts of the world.The diarrhea caused by *Salmonella typhimurium* dependes on colonization of the bacteria in small inlestine.The purpose of this research is Stady effects of mulistrain *Lactobacillus acidophilus* and *Bifido bacteriumon* coloniziation of *Salmonella typhimurium* and blood factors variations in male Rats.

In this study, different experimental on 5 groups of male Rats including a group with **Methodology**:simultaneous treatment of probiotic and bactria injection(group 1), a group with bactria injection and then treatment with probiotic after infection (group 2),

a group with bactria injection without any treatment (group 3), a group with probiotic treatment (group 4)and finally a control group have been performed.the infecting operation was performed through injection of 1 ml of *Salmonella typhimurium* bacteria in neck area and probiotic treatment .

Discussion and results:Comparison of average bacteria numbers in excretion samples of 4 experimental groups showed that there is a meaningful relation between control and other groups .Reciprocal effects of sampling dates in experimentalgroups showed a considerable difference between probitic treatments in reduction of intestinal infection severity with *Salmonella.*After ending the periods of experiment,the results of reviewing the blood factors and liver and kindney is weight in rats was as follows :the white blood cell and platelets were increased in coparison with control group,but there was no significant difference in Kindney weight and other blood factors.

Keywords: Probiotic,Antimicrobial activity, *Salmonella typhimurium*

شناسه: PH1

بکارگیری ترکیبات لبنی پروبیوتیکی و تاثیرات آنها بر متابولیت های لیپیدی

هادی زمانی[1]، دکترشهربانوعریان[1]، دکترپریچهریغمایی[1]

1 – دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران– گروه زیست شناسی

مصرف محصولات لبنی در جهت سلامت و تغذیه انسانها از مدتها قبل متداول بوده است بطوریکه بیشترین سهم مصرف فراورده های لبنی را شیر بخود اختصاص می دهد. ماست نیز یک فرآورده تخمیری نیمه جامد شیر میباشد که در نتیجه فعالیت میکروارگانیسم *لاکتوباسیلوس کازئی* حاصل می شود(9،5) . در دهه های اخیر ، با پیشرفت های بیوتکنولوژی تحولات چشمگیری در جهت بکارگیری باکتریهای مفیدی بنام پروبیوتیک در صنایع لبنیات و مواد غذایی و دارویی بعضی از کشورها ایجاد شده است. پروبیوتیکها ، میکروارگانیسم هایی هستند که با بهبود بخشیدن به تعادل میکروبی میکروفلور بومی در بدن ، می توانند اثرات سودمندی را بر جای گذارند(2). بنابراین کاربرد این باکتریهای پروبیوتیک در فرایند تولید لبنیات منجر به ایجاد محصولاتی از جمله ماست پروبیوتیک می گردد (10،4).

از جمله مسائل مهم پایداری باکتریهای پروبیوتیک بکار رفته در محصول است به این دلیل که بقا و زنده ماندن این باکتریها در طول مدت نگهداری فراورده باید حفظ شود تا باکتریهای پروبیوتیک بتوانند بیشترین تاثیرات مثبت خود را بر جای گذارند (1). *لاکتوباسیلوس* کازئی از میکروارگانیسمهای خانواده باکتریهای اسید لاکتیک بوده و بعنوان یکی از مهمترین باکتریهای پروبیوتیک محسوب می شود و اثرات سودمندی در سلامتی میزبان دارد. بطوریکه در کاهش میزان کلسترول و تری گلیسیرید، فعالیت ضد میکروبی بر علیه پاتوژنها، ایجاد تعادل مطلوب در میکروفلور طبیعی، و کاهش عدم تحمل لاکتوز و بسیاری عملکردهای دیگر نقش بارزی دارد (6). برای انجام این تحقیق از کشت خالص باکتری *لاکتوباسیلوس* کازئی استفاده شد سپس برای جدا سازی باکتری از محیط MRS آگار استفاده و در انکوباتور بی هوازی (Co_2 دار) به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. بعد از این زمان، از کلنی هایی که روی محیطهای کشت رشد داشته اند استفاده گردید. سپس از پلیت کشت خالص باکتری روی محیط مورب کشت داده و پس از مرحله گرمخانه گذاری و رشد این باکتریها روی سطح مورب، محلول PBS– گلیسرول (فسفات بافر سالین+ گلیسرول) را آماده نموده و با اضافه کردن این محلول درون لوله، با پیپت استریل سطح محیط کشت مورب را که شامل کلنی های رشد کرده باکتری است، شستشو داده بطوریکه در انتهای لوله سوسپانسیونی از باکتری ایجاد شده و در نهایت از این سوسپانسیون باکتریایی با پیپت درون ویالها ریخته و در فریزر $-80^{\circ}C$ نگهداری گردید. پس از طی مدت زمان لازم برای رشد باکتریها و ظاهر شدن کلنی مربوط به آنها به منظور تلقیح شیر با این باکتریها، باید سوسپانسیون آنها را تهیه نمود، پس

از تهیه سوسپانسیون، OD را در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین کرده (تعیین OD به منظور تعیین تعداد سلولهای باکتریایی در هنگام تلقیح می باشد). پس از تعیین OD، با روش سریال دایلوشن تعداد سلولهای باکتریهای مورد تلقیح را مشخص نموده، بطوریکه تعداد سلولهای باکتریایی وارد شده به شیر برای هر باکتری برابر با $۱۰^{۲}$cfu/ml خواهد بود.در محیط های حاوی کیت های کلسترول و تری گلیسرید نمونه سوسپانسیونی میکروبی را اضافه نموده و به ترتیب غلظت لیپید های موجود در محیط را پس از گذشت 24، 48 و 72 ساعت اندازه گیری نمودیم که نتایج زیر بدست آمد:

با توجه به گذشت 24 ساعت میزان کلسترول حدود 3 درصد و میزان تری گلیسرید موجود در محیط 3/7 درصد کاهش یافت .

و با گذشت 48 ساعت میزان کلسترول حدود3 /9 درصد و میزان تری گلیسرید موجود در محیط 4/4 درصد کاهش یافت.

و با گذشت 72 ساعت میزان کلسترول حدود4 /2 درصد و میزان تری گلیسرید موجود در محیط 4/95 درصد کاهش یافت.

بدین ترتیب می توان نتیجه گیری نمود که باکتری های پروبیوتیکی مورد استفاده در صنایع لبنی می توانند بعنوان باکتری های سودمند وبا اثرات داروئی بالا جهت بیماران مبتلا به افزایش چربی خون مورد استفاده قرار گیرند. لذا بعنوان پیشنهاد جهت بکار گیری این باکتری ها و به طور کلی پروبیوتیکی ها در صنعت داروئی کشور در محیط Invivo میتوان این پروژه را گسترش و ادامه داد.

شناسه: PH2

http://www.google.com/imgres?imgurl=http://www.imi.ir/ns1/library/new/Icons/azad.jpg&imgrefurl=http://www.imi.ir/ns1/library/new/Links.htm&h=659&w=440&sz=83&tbnid=ycjoTvV22RQM5M:&tbnh=138&tbnw=92&prev=/images%3Fq%3D%25D8%25A2%25D8%25B1%25D9%2585%2B%25D8%25AF%25D8%25A7%25D9%2586%25D8%25B4%25DA%25AF%25D8%25A7%25D9%2587%2B%25D8%25A2%25D8%25B2%25D8%25A7%25D8%25AF%2B%25D8%25A7%25D8%25B3%25D9%2584%25D8%25A7%25D9%2585%25D9%258A&hl=en&usg=__A8lC5pv-j8E1O_1Q-RdMysMhlE0=&ei=TTFRS9r6IcTD_gaVzdymCg&sa=X&oi=image_result&r

بررسی تاثیر سینرجیسمی گردو بر تحریک تولید آنتی بیوتیک Tyrothricin توسط انتروکوک

یگانه مهسا[1*] ، خنافری آنیتا[2] ، فلاحیان محمدرضا [3] ، شریفان انوشه [4]**

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد صنایع غذایی، mahsayeganeh19@yahoo.com

2- دانشیار گروه میکروب شناسی ، khanafari _ a @yahoo.com

3- مربی گروه میکروب شناسی ،

4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی

1و4- دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

2و4- گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

هدف از انجام این تحقیق، بررسی تاثیر سینرجیسمی گردو بر روی تحریک تولید آنتی بیوتیک Tyrothricin توسط انتروکوک و افزایش خاصیت ضدمیکروبی آن می باشد. پس از کشت انتروکک فکالیس با مشخصه PTCC=1394 در محیط کشت BHI agar، سانتریفوژ و جداسازی توده میکروبی، ماده ضدمیکروبی آن توسط روش دیالیز خالص سازی شد و به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE، وزن مولکولی آن تخمین زده شد. اثر ضدمیکروبی ترکیب حاصل بر باکتریهای شاخص گرم مثبت و گرم منفی به روش انتشار در آگار و چاهک مورد بررسی قرار گرفت.نتایج حاصل از این تحقیق وزن مولکولی Tyrothricin استخراج شده را 66 کیلودالتون نشان داد که از نظر وزن مولکولی مشابه Tyrothricin بعنوان ترکیب بارز ضدمیکروبی انتروکک است. غلظت، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی این ترکیب و میزان پروتئین کل در نمونه های شاهد (فاقد گردو)پس از دیالیز، 0.538g/L ,7750U,310U/mL ,576.21U/mg ,13.45mg و در نمونه های حاوی آنتی بیوتیک و گردو، 0.541g/L ،460 U/mL ,11500U ,850.28U/mg ,13.525mg تعیین گردید. قطر هاله عدم رشد

و حداقل غلظت باکتریواستاتیکی ایجاد شده، توسط نمونه های شاهد حاوی آنتی بیوتیک و نمونه های حاوی آنتی بیوتیک و گردو، پس از دیالیز، در لیستریا مونوسیتوژنز، 8 mm و 20 mm ، 0.8 g/L و 0.08 g/L ، در استافیلوکوکوس ارئوس، 19 mm و 22 mm ، 0.2 g/Lو 0.04g/L، در باسیلوس سرئوس، 0 mm و 10 mm ، 0.8 g/Lو 0.08 g/L شد. با توجه به نتایج به دست آمده از این گیاه، گردو می تواند بر روی غلظت، واحد فعالیت، فعالیت کل، فعالیت اختصاصی و میزان تولید Tyrothricin در انتروکوک و اثر ضد میکروبی آن نقش سینرجیسمی داشته باشد. کلمات کلیدی:گردو، Tyrothricin ، انتروکک فکالیس، اثر ضدمیکروبی، سینرجیسم

شناسه: PH3

مقایسه میزان رشد و تولید بتاکاروتن جلبک تک سلولی دونالیلا جدا شده از چهار دریاچه شور ایران

جانی پور، اعظم*.، مظاهری اسدی، مهناز تولایی، سعیده**

سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایرانa_janipour7@yahoo.com64

امروزه استفاده از ریزجلبک ها برای تولید غذاهای فراویژه، مکمل های غذایی، مواد دارویی و مواد شیمیایی خالص در حال افزایش است. یکی از این ریزجلبک ها که در سال های اخیر، تحقیقات زیادی را بویژه در زمینه تولید غذاهای فراویژه به خود اختصاص داده، جلبک سبز تک سلولی دونالیلا است. دونالیلا بهترین منبع تجاری بتاکاروتن طبیعی و کارتنوئیدها در جهان به حساب می آید. بتاکاروتن، یک رنگیزه ترپنوئید است که به علت داشتن منفعت های غذایی مثل پیش ساز ویتامین A و داشتن خواص آنتی اکسیدانی دارای ارزش بسیار می‌باشد. بتاکاروتن به علت داشتن خصوصیاتی نظیر عامل رنگ کننده غذا، افزودنی های آرایشی، داشتن پیش سازهای مولتی ویتامین و غیره مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. مثلاً، در آبزی پروری، علاوه بر تولید رنگیزه به سلامت و تولید مثل ماهی‌ها کمک می کند. در این تحقیق، نمونه های آب از 4 دریاچه شور ایران (دریاچه ارومیه، دریاچه حوض سلطان، دریاچه نمک قم و باتلاق گاوخونی) جمع آوری گردید و بعد از جداسازی جلبک دونالیلا، منحنی رشد، سرعت مخصوص رشد و میزان بتاکاروتن، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

برای خالص سازی از روش‌های مختلف نظیر افزودن آنتی بیوتیک، افزایش شوری وغیره استفاده شد. بطری های ارلن مایر محتوی 500 میلی لیتر از محیط کشت اصلاح شده جانسون با 25 میلی لیتر از نمونه ها تلقیح و تحت شرایط دمایی 2_+20 درجه سانتی گراد تحت چرخه نوری 12/12 ساعت نور/تاریکی با شدت نوری 1000 لوکس قرار گرفتند. سرعت مخصوص رشد (μ) توسط شمارش سلولی با استفاده از میکروسکوپ نوری و هموسیتومتر انجام گرفت.

در فاز رشد لگاریمی نمونه ها تحت استرس شوری تا 4 مولار NaCl و شدت نوری 6000 لوکس قرار گرفتند. میزان بتاکاروتن تولید شده اندازه گیری و مقایسه شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که افزایش شوری و pH، بهترین روش خالص سازی جلبک دونالیلا است.

بالاترین میزان بیوماس و سرعت مخصوص رشد در نمونه های جلبک دریاچه شور ارومیه مشاهده شد در حالی که بیشترین میزان بتاکاروتن تولید شده از نمونه های جلبک دونالیلا جدا شده از دریاچه نمک قم به دست آمد.

کلمات کلیدی: دونالیلا، بتاکاروتن، غذاهای فراویژه، دریاچه های شور ایران، خالص سازی

Comparison of growth and β-carotene producing single-cell alga *Dunaliella* isolated from four saline lakes of Iran

Janipour, a*., mazaheri assadi, m**., tavallaie, sa_janipour7@yahoo.com

Biotechnology Dept. IAT, IROST. Tehran, Iran.

Today, the use of microalgae as food supplements and using in functional food as well as pharmaceutical and chemical material is increasing. During recent years, one of the microalga that a lot of research devoted to, particularly in terms of functional food, is single-cell green alga, *Dunaliella*. This alga is the best commercial source of natural β-carotene in the world. The β-carotene is a terpenoid pigment that is highly valuable due to its nutritional benefit as a precursor of vitamin A and for its antioxidant properties. β-carotene is marketed as a food coloring agent in food, as an additive to cosmetics, for multivitamin preparation and etc. For example, in aquaculture contribute to the health and reproduction of fish, as well as their pigmentation. In this work, water samples were collected from the four hypersaline lake of Iran (Urmia, Hoze-soltan, Qom lakes and Gave-khooni salt marsh). After isolation the *Dunaliella*, growth curve, specific growth rate and the rate of β-carotene production were studied and compared. Various methods such as adding antibiotic, increasing salinity and etc were used for purification. Erlenmeyer flasks containing 500 ml of modified johnson medium were inoculated with 25 ml of the samples and incubated at 20+_2°c under 12:12 h light/dark cycle with light intensity of 1000 lux. The specific growth rate (μ) was calculated by cell counting using a light microscope and haemocytometer. In the logarithmic phase, salt stress was performed with 4 M NaCl by adding NaCl and light intensity of 6000 lux to the medium. B-carotene production rate was measured and compared. According to the results, the best approach for purification *Dunaliella* is increasing salinity and pH. The highest biomass and specific growth rate (μ) of algae were obtained from samples which were collected from Urmia salt lake while the highest rate of β-carotene production was by algae *Dunaliella* samples isolated from Qom salt lake.

Keywords: Dunaliella; β-carotene; Functional Food; Iran salt lakes; purification

شناسه:PH4

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه های انتروکوکسی با پتانسیل پروبیوتیک جدا شده از پنیر خانگی

اسلامی صولت[1]- حجازی محمد امین[1] – محمدیان الهام[1]- ابراهیمی ایوب*[1]- گلابی مصطفی[1]**

1- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور

از توانائی باکتریهای اسید لاکتیکی برای تولید مواد ضد میکروبی در طول تاریخ برای نگهداری مواد غذائی گوناگون استفاده شده است. هدف از این مطالعه بررسی تشکیل، طیف فعالیت، و غربالگری اولیه سویه های انتروکوکسی برای تولید باکتریوسین بود.

طیف بازدارندگی 6 انتروکوکسی با پتانسیل پروبیوتیکی بوسیله روش دیسک گذاری بر علیه چند باکتری گرم مثبت و گرم منفی بررسی شد. مایع رویی انتروکوکسی کشت داده شده در محیط MRS براث به دو حالت pH خنثی و طبیعی بر روی دیسکهای تعبیه شده بر روی محیط کشت مولر هینتون، تلقیح شده با باکتریهای تست افزوده شدند. نتایج مثبت به عنوان نواحی روشن در اطراف دیسکها بعد از گرمخانه گذاری شبانه قابل شناسائی بودند.بیشترین فعالیت بازدارندگی زمانی مشاهده شد که pH مایع های روئی طبیعی بودند، اما در بعضی موارد مایع های روئی با pH خنثی فعالیت بازدارندگی بیشتری نشان دادند. اشرشیاکلی و لیستریا اینوکوا حساس ترین باکتریهای مورد آزمایش بودند و به ترتیب بوسیله کلبسیلا، باسیلوس سوبتیلیس، یرسینیا انتروکولیتیکا، و استافیلوکوکوس ارئوس دنبال شدند. نتایج نشان دادند که علاوه بر اسیدهای آلی مواد ضد میکروبی دیگری بر علیه باکتریهای شناساگر مورد آزمایش در این مطالعه وجود دارند. همچنین، از آنجائی که سویه های یک گونه طیف بازدارندگی متفاوتی نشان دادند، طیف ضد میکروبی وابسته به سویه بود.فعالیت ضد میکروبی مایع های روئی با pH خنثی می تواند به خاطر حضور سایر متابولیتهای ضد میکروبی مانند باکتریوسینها و باکتریوسین مانندها توضیح داده شود. این سویه ها میتوانند برای شناسایی این مواد ضد میکروبی بیشتر مطالعه شوند.

کلمات کلیدی: انتروکوکسی- باکتریوسین- طیف بازدارندگی

Assessment of antimicrobial activity of potentially probiotic isolated from homemade chesse

Eslami solat, hejazi mohammad amin[1], mohammadian elham[1], ebrahimi ayyob*[1], golabi mostafa[1]**

1- Agriculture biotechnology research institute northwest and west of Iran

Introduction:The ability of lactic acid bacteria to produce antimicrobial substances has historically long been used to preserve various foods. The aim of this study was to investigate the formation, spectrum of activity, and preliminary screening of Enterococcus strains to produce bacteriocins.

Methods and materials:The inhibitory spectrum of 6 potentially probiotic Enterococci isolated from homemade cheese were assayed by disc diffusion method against a range of gram- positive and gram –negative test organisms. The pH neutralized and Unneutralized cell free supernatant of Enterococci grown in MRS broth were dropped on sterile paper blank discs placed on the indicator bacteria seeded Muller Hinton agar plates. Positive results were detectable as clear zones around the discs after overnight incubation.

Results:Generally, highest inhibitory activity was observed when the pH_s were Unneutralized (acidic conditions), but in some cases the pH- adjusted supernatants showed higher inhibitory activity than Unneutralized ones. Escherichia coli and Listeria Innocua were the most sensitive indicator tested and fallowed by klabsiella, Bacillus subtilis, Yersinia Enterocolitica, and Staphylococcus aureus. Results showed that there are some additional antimicrobial substances rather than organic acids against indicator bacteria tested in this study. Also, the inhibitory spectrum of Enterococci was strain-dependent as the strains within the same species showed different spectrum.

Conclusion:Antimicrobial activity in modified pH can be explained owing to the presence of other antimicrobial metabolite such as bacteriocin or bacteriocin like products. These strains should be exploited further for more in-depth to demonstrate the circumstances of these antimicrobial substances.

Key words: Enterococci- bacteriocin- inhibitory spectrum

شناسه :PH5

ارزیابی مشخصات پروبیوتیک باکتری های اسید لاکتیک تازه جدا شده

تیهو مرتضی[1]**

1–دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان ، دانشکده علوم پایه ، گروه میکروبیولوژی ، لاهیجان ،ایران

باکتری های اسید لاکتیک از گیاهان تخمیر شد ، دوغ ترش ، فرآورده های شیر فضولات گوسفند و انسان جدا گردید. کشت های تازه جدا شده از نظر تعدادی از ویژگی های پروبیوتیک مواد ارزیابی قرار گرفتند از جمله مقاومت نمک صفرا ، مقاومت نمک به طور کل ، بقاء در pH پائین ، قدرت آبگریزی سطح سلول ، مقاومت نسبت به غلظت پائین فنول ، فعالیت ضد میکروبی و الگوی آسیب پذیری در مقابل ونکومایسین و اریترومایسین ، کشت های گزینش شده از نظر قابلیت تولید مواد مغذی مانند اسیدفولیک و اگزوپلی ساکارید (EPs) مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند ، مشخص گردید دو جدایه قوی ـ CB2 (از کلم) و SD2 (از دوغ ترش) هم اسیدفولیک برون سلولی و هم درون سلولی تولید می کند. یکی از جدایه های به دست آمده از ماست (MC-1) و یکی از جدایه های به دست آمده از کشک (w3) مقادیر قابل توجهی EPs را با حداکثر تولید $8.79 \pm o.05 \ g/L$ توسط MC-1 تولید نمود.6

لغات کلیدی : باکتری های اسیدلاکتیک ، پروبیوتیک ، مواد مغذی ، اگزوپلی ساکارید ، اسید فولیک.

شناسه:PH6

شناسایی و خالص سازی باکتریوسین های تولیدی توسط برخی لاکتوباسیلوس های جدا شده از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران

مریم تاج آبادی ابراهیمی [**]، وحیده سادات نوروزیان [*] ، انوشه شریفان، مریم هاشمی

ebrahimi_mt@yahoo.com, s_vahideh_n@yahoo.com ,a_ sharifan2000@yahoo.com , hashemi348@yahoo.com

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات،دانشگاه شهید بهشتی

امروزه ایمنی و سلامتی غذا یکی از نگرانی های مهم کشورهای جهان می باشد.مصرف غذاهایی که اکثر آنها دارای نگهدارندهایشیمیایی مانند نیترات و بنزوات می باشند موجب نگرانی مصرف کنندگان و در خواست آنها برای استفاده از نگهدارندهای طبیعی شده است.با توجه به عوارض جانبی و اثزات سرطان زایی ناشی از نگهدارندهای شیمیایی، باکتریوسین ها می توانند به عنوان نگهدارنده های طبیعی مورد استفاده قرار گیرند.باکتریوسین ها تر کیبات ثابت ، قابل هضم، قابل تجزیه ، سلا متی بخش،و دارای فعالیت در غلظت های کم هستند دراین بررسی سویه هایی از لاکتوباسیل‌های مقاوم به شرایط اسیدی بومی ایران که از نمونه‌های گوناگون محصولات لبنیتخمیری سنتی جداسازیشده‌اند از نظر تولید باکتریوسین بررسی می‌شوند.ابتدا در محیط کشت MRS brothکشت وتکثیر می شوند سپس با کشت خطی در محیطMRS agarاز لاکتوباسیلها کلنی خالص تهیه می شود. سپس توانایی مهار کنندگی رشد با کتریهای آلوده کننده مواد غذایی بر پایه استفاده از باکتری‌ها پاتوژن اندیکاتور ردیابی می‌شود.سپس سویه های منتخب از مر حله قبل از نظر ترکیبات ضد مکیروب سنجش می شوند در نهایت برترین باکتریوسین انتخاب وخالص سازی می شود.در صنعت باکتریوسین نه تنها به عنوان نگهدارندهای بیولوژیک در محصولات غذایی بلکه به عنواco culture برای ایجاد عطر و طعم مطلوب به همراه کاهش میکروبهای بیماری زا در

فرآورده نهایی می توان استفاده کرد. از سوی دیگر، این سویه‌ها مقاوم به شرایط اسیدی pH=2.5 بوده و می توانند گزینه‌های مناسبی جهت انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک بومی ایران باشند.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیلء باکتریوسینء نگهدارنده های بیولوژیکء محصولات لبنی سنتی تخمیری.ءپروبیوتیک

Isolation and characterization of bacteriocins produced by som lactobacillus isolated from traditional fermented dairy products of Iran

Maryam Ebrahimi[**], Vahideh sadate norouzian[*], Anoosheh Sharifan, Maryam Hashemi

Ebrahimi_mt@yahoo.com , s_vahideh_n@yahoo.com ,a_ sharifan2000@yahoo.com , hashemi348@yahoo.com

IAU Tehran Central Branch, IAU Science & Research Branch, IAU Science & Research Branch,Shahid Beheshti University.

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria have received particular attention in recent years due to their potential application in the food industry as natural preservatives. This trend reflects the increasing consumer awareness of the risks derived not only from foodborne pathogens, but also from the artificial chemical preservatives like nitrat and benzoate used to control them Also, the use of these bacteria and their metabolites is generally accepted by consumers as bio-preservation.bacteriocins are food stable,digestable,safe to health and active at low concentrations.In this study purpose is observed

Strain of lactobacillus isolated from traditional dairy product that are resistant to acid condition.at the

Beginning,strains cultured in MRS broth then make pure colony of lactobacilluse in MRS agar,There

for evaluate effect of this strains against andicator pathogen then selected strains appraise from the direction of antibacterial compund.finally ,the best bacteriocin selected and purified.

Bacteriocin can be used as biopreservative in food

Keyword :lactobacill, bacteriocin, biopreservative,fermented product

شناسه: PH7

بررسی کاهش امکان سرطان با استفاده از سویه های باکتریهای اسید لاکتیک جداشده از ترخینه با آزمون Ames

مهرابیان صدیقه[1]، تاج آبادی ابراهیمی مریم [2]، عباس احمدی مریم[3]

عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال mehrabian-s@yahoo.com

عضوهیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی Ebrahimi-mt@yahoo.com

دانشجوی کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد تهران شمالahmadi.3916@gmail.com

مقدمه وهدف: مواد شیمیایی سرطان زا ممکن است توسط میکروبهای ساکن دستگاه گوارش ایجاد شوند.تحقیقات انجام شده استفاده از باکتری های اسید لاکتیک موجود در ترخینه را در کاهش سرطان پیشنهاد می کند. هدف از این پژوهش بررسی اثر مهارکنندگی باکتریهای اسید لاکتیک برگسترش سلولهای جهش یافته و سرطانی است.

روش بررسی:در این مطالعه بنیادی اثر ضد جهشی کشت باکتری های اسید لاکتیک شامل 15 سویه لاکتوباسیلوس و5 سویه لاکتوکوکوس جداشده از ترخینه روی کاهش فعالیت جهشی و سرطان زائی ماده سرطانزای آزید سدیم با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA100 ومیکروزوم مطابق آزمون Ames انجام شد.

یافته ها:اثر ضد جهشی و ضد سرطانی باکتری های اسید لاکتیک مشاهده شد. درصد کاهش اثرسرطان زائی در اغلب موارد بالای 40 درصد بود که نشان دهنده اثر ضد سرطانی قوی آنها می باشد.

واژگان کلیدی : سرطان، باکتری های اسید لاکتیک، سالمونلا تیفی موریوم ، میکروزوم

Decreased risk of cancer by Lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh

by Ames test

Mehrabian, S.[1], Tajabady Ebrahimi, M.2, Abbas Ahamadi, M.[3]

1-Scientific member, Islamic Azad. University, North Tehran Branch2- Scientific member,Islamic Azad University, central Tehran Branch 3-Islamic Azad. University, North Tehran Branch

Background:chemical carcinogens may be produced by metabolic activity of microbes residing in gastrointestinal system. Research suggest that the consumption of Lactic acid bacteria in Tarkhineh may decrease the risk of cancer.The aim of this study was to evaluate inhibitory effect of lactic acid bacteria culture on mutant and cancerous cells.

Material and methods:In this experimental study, antimutagenic effects of Lactic acid bacteria culture, including 15 strains Lactobacillus spp and 5 strains Lactococcus spp isolated from Tarkhineh ,were assessed the Salmonella typhimurium /microsome assay upon sodium azid by Ames test.

Results:There were anticancer and antimutagenic activities of Lactic acid bacteria cultures.Anticarcinogenic effects of Lactic acid bacteria cultures were mostly above %40 representing their potent anticarcinogenic activities.
Keywords: Cancer,Lactic acid Bacteria,Salmonella typhimurium,microzome

شناسه : PH8

بررسی فعالیت ضد میکروبی برخی باکتری های پروبیوتیک (جدا شده از ماست محلی) در برابر باکتری های بیماریزای روده

مهدیه شیرزاد

امروزه شواهد فراوانی مبنی بر اثرات مفید مصرف غذاهای پروبیوتیکی وجود دارد. باکتری های اسید لاکتیک مانند لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکتری ها از متداول ترین پروبیوتیک ها محسوب می شوند. محصولات غذایی پروبیوتیکی می توانند اثرات مفیدی بر سلامت انسان داشته باشند.

در این پژوهش، 10 نمونه ماست از نقاط مختلف استان مازندران جمع آوری شد. پس از جداسازی، رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، جدایه ها بر اساس الگوی تخمیر قندشان شناسایی شدند. PCR بر اساس پرایمرهای اختصاصی برای ژن های 16s rRNA لاکتوباسیل ها انجام شد. مقاومت باکتری ها تحت شرایط اسیدی (pH 2) و نمک های صفراوی (اکسگال 0/3٪) مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت مهاری آنها نیز به دو روش انتشار در چاهک و کشت نقطه ای، نسبت به سویه های پاتوژن روده مورد بررسی قرار گرفت.

در طی مراحل غربال سازی، 25 سویه از باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شدند. بر اساس بررسی های مولکولی، این سویه ها به 6 گونه مختلف تعلق داشتند. 3 مورد از این سویه ها به شدت در برابر pH اسیدی و املاح صفراوی مقاومت نشان دادند. برخی از این سویه ها در برابر پاتوژن های روده ای فعالیت ضد میکروبی بالایی نشان دادند.

از دیر باز در ایران این باور وجود داشته که ماست دارای اثرات درمانی بوده و از آن در کاهش علائم ناهنجاری های روده ای استفاده می شد. یافته های ما این باور را تا حدود زیادی اثبات کرد. برخی از این پروبیوتیک ها، گزینه های بسیار خوبی برای استفاده در غذاهای لبنی پروبیوتیک می باشند. همچنین این جدایه ها می توانند به منظور بهبود میکروفلور روده و پیشگیری از بیماری های گوارشی مورد استفاده قرار بگیرند.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، ماست، فعالیت ضدمیکروبی، روده

Antibacterial activity of some probiotic bacteria (isolated from local yogurt) against enteropathogenic bacteria

There is increasing evidence indicating health benefits by consumption of foods containing microorganisms, i.e. probiotics. Lactic acid bacteria (LAB) such as *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* are the most common types of probiotics. Such probiotic-containing dairy foods are associated with a range of health claims.

In this sudy, 10 local yogurt from different parts of Mazandaran province were collected. After isolation, gram staining and catalase test, the isolates were identified by comparing their sugar fermentation patterns. PCR method was established using specific primers for targeting 16s rRNA genes of different lactobacilli. The viability of the isolated strains under acidic pH 2 and bile salt (0.3% oxgall) was evaluated. The inhibitory activity of the isolates against enteropathogenic bacteria was also determined by agar well diffusion method and spot test.

During preliminary screening, a total of 25 LAB strains were isolated. According to molecular study, these isolates were from 6 different species. Three of the isolates were highly resistant to acidic pH and high concentration of bile salts. Some of them had high antibacterial activity against enteropathogenic bacteria.

Yogurt has been believed to hold some therapeutic effects and used to decrease abdominal discomfort since ancient times in Iran. Our findings prove such a belief to some extent. Some of these isolates were good probiotics for producing probiotic-containing dairy foods. The isolates can be use for improving gastrointestinal flora and preventing infectious gastrointestinal diseases.

Key words: probiotic, yogurt, antimicrobial activity, gut.

شناسه:PH9

عنوان : بررسی ویژگی های شیمیایی وحسی ماست قالبی پروبیوتیکی باکاربرد کشت های آغازگر مخلوطی ABY2

مرجان مشفق

دراین مطالعه کشت های مخلوطی پروبیوتیکی ABY2(بیفیدوباکتریوم.بیفیدوم (BB12)، لاکتوباسیلوس.اسیدوفیلوس(LA5)، ال..بولگاریکوس اس. ترموفیلوس)(DVS-Ch Hansen Denmark) برای تولید 2 نوع ماست قالبی کم چرب وپرچرب درشرایط آزمایشگاهی استفاده شد. شیر مورداستفاده اولیه پس ازاستاندارد شدن درصد چربی وماده خشک بی چربی درآزمایشگاه با دستگاه هوموژنیزاتور (Niro Soavi GEA Italy) با فشار 180 بار و دمای 65 درجه هوموژن شده و در حمام آب داغ (Funke Gerber Germany) پاستوریزاسیون در دمای 95 درجه سانتی گراد 5 دقیقه صورت گرفت در دمای 43 درجه میزان 2/5 درصد (w/v) کشت ABY2 (50U) به ماست ها تزریق گردید و در گرمخانه تا رسیدن اسیدیته 74 درجه دورنیک و(pH=4.56) حدود 4ساعت نگهداری شدند سپس ماست های کم چرب وپرچرب به سردخانه 5 درجه سانتی گراد انتقال داده شدند، نتایج آزمون شیمیایی سردخانه 24 ساعته ماست کم چرب2/5 درصدچربی دارای اسیدیته 90 درجه دورنیک (pH=4.32)و ماست پرچرب 4/25 درصدچربی دارای اسیدیته 93 درجه دورنیک و (pH=4.3) بودند که بیانگر اسیدسازی ثانویه آغازگرهای پروبیوتیک و آغازگرهای گرمادوست ماست بود که بیشتر به آغازگر ماست ال. بولگاریکوس واس. ترموفیلوس می توان نسبت داد و توسعه اسیدیته بیشتر از ماست های شاهد مشاهده شدکه به خواص همیاری رشد پروبیوتیک ها درکنار آغازگرهای ماست می توان نسبت داد. بررسی ویژگی های حسی (رنگ، عطروطعم، انسجام بافت وآب انداختن)توسط ارزیابان حسی نشان داد که ماست های کم چرب و پرچرب بادارابودن ویژگی عطروطعم ضعیفتراز ماست شاهد پروبیوتیکها در تولید عوامل عطروطعم (استالدییدی و...) ضعیفتر از آغازگرهای گرمادوست ماست هستند ولی آزمون های بافت نشان دادند که ماست های پروبیوتیکی کم چرب وپرچرب بافت باقوام بیشتری داشتند .در بخش تولید صنعتی ماست کم چرب 1/45 درصد با گرمخانه گذاری 3/25 ساعت دمای 43درجه ورسیدن به اسیدیته 70 درجه دورنیک (pH=4.45)پس از 24 ساعت دارای اسیدیته 108 درجه دورنیک و(pH=4.02) بود که نتایج اسیدسازی ثانویه تولید همانند بخش آزمایشگاهی مشاهده شد و ماست ها در 2شرایط دمای محیط 20 درجه و 5 درجه 20روزه بررسی شدند. ماست های سردخانه ای اسیدیته 120 درجه دورنیک و(pH=3.85) داشتند که با شرایط رشدوبقای پروبیوتیک ها تاحدی مغایرت داشتند و در دمای محیط 20 درجه (همانند شرایط نگهداری بیرون از یخچال در فروشگاه ها و مغازه ها)اسیدیته 187 درجه دورنیک و(pH=3.55) را نشان دادند و این نوع ماست ها بهتر است در دمای 5درجه نگهداری شود وپیشنهاد می شود که از گونه های آغازگر با تولیداسید ثانویه کم در کنار آغازگرهای پروبیوتیکی به صورت ضمیمه ای به کارگرفته شود تا رهیافت های خوب و شرایط

اسیدسازی کنترل شده در حدایدآل پروبیوتیک ها در دمای نگهداری سرد و دمای محیط حاصل گردد. ***کلیدواژه*** : **پروبیوتیک**

ضمیمه ای، ماست قالبی ، اسیدسازی ثانویه

Research on the Chemical and Sensory Evaluation of Probiotic Set Yoghurt Using Starter Culture ABY2

In this study we have used the starter culture ABY2 (Bifidobacterium. Bifidum (BB12),Lactobacillus.acidophilus(LA5),Lactobacillus.bulgaricus ,streptococcus.thermophilus), (DVS-Ch Hansen ,Denmark) for the production of 2 kinds of Set yoghurt (Low fat, Full fat) in laboratory scale. Primarily Milk after standardization of the (Fat) and (Solid not fat) Homogenized at 180 bar and 65(*C)by using Homogenizator (Niro Soavi GEA, Italy) and then Pasteurized using Pasteurizator (Funke Gerber, Germany) at 95(*C) during 5 minutes then Cooled up to 43(*C) and inoculated 2.5 % (v/v) the starter culture ABY2, finally have evaluated during Incubation 43(*C) up to reaching the Acidity approximately 74(*D) and pH=4.56 for 4 hours and then stored at cool place at 5(*C). The results of the chemical analysis after 24 hours of cool storage 5(*C) of the low fat(2.5 % Fat) probiotic set yoghurt have shown the Acidity approximately 90 *D and pH=4.32 as well as for Full fat (4.25% fat) set yoghurt with the Acidity 93 (*D) and pH=4.3 which have shown the Post acidification of probiotic in the presence of thermophilic yoghurt starter cultures that was more appears to be because of Yoghurt Starter cultures which expressed Symbiotic effect of Probiotics in the presence of yoghurt starter cultures. The results of sensory evaluation (colour, flavour, texture and synersis)of probiotic yogurts represented that they were weaker to production of Flavour agents(Acetaldehyde and so on)in comparison to the control yoghurt but The Results of Texture analysis of yoghurts have shown that probiotic set yoghurt (low fat and full fat) were have produced stronger texture than control yoghurts.in part of pilot scale production of low fat (1.45 % fat) Probiotic set yoghurt after 3.25 hours Incubation in 43(*C) and they have

Reached to the Acidity 70(*D) and pH=4.45 and after 24 hours cool storage in 5(*C) led to Acidity 108 (*D) and pH=4.02 that showed unsuitable situation for the survivality and growth of probiotics in presence of yoghurt starter cultures which results of post acidification were the same as the results in laboratory scale and the results of post acidification of 2 kinds storage temperatures (ambient temperature 20 (*C) and cool storage 5 (*C) have evaluated after 20 days at the end of shelf life storage , probiotic yoghurts in cool storage have showed the Acidity 120 (*D) and pH=3.85 as well as this, yoghurts at ambient temperature 20(*C) had Acidity 187 (*C) and pH=3.55 which represented that those yoghurts in ambient temperature like shops and stores outside of refrigerator became sour yoghurts which supposed to keep in cool place to avoiding more post acidification as well as suggested to use of some species of thermophilic yoghurt starter culture with low post acidification effect in the presence of probiotic as adjunct starter cultures to find good approaches to monitor acidification of the thermophilic starter culture for the optimal growth and survivality of probiotics in yoghurt substrates for the storage in cool place and ambient temperatures.

Keywords: adjunct probiotics, Set yoghurt , Post acidification

شناسه: PH10

مقایسه اثر منعقد کننده های مختلف در تهیه پنیر سویا (توفو)

تهمینه تقی زاده[117*و18]، سید علی مرتضوی[2] ، فرزانه عزیز محسنی[3] ، داود زارع[3]**

1. کارشناس ارشد صنایع غذایی، دانشگاه آزاد سبزوار و پژوهشکده بیوتکنولوژی ، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران- tahminehtf@yahoo.com

2. عضو هیئت علمی داسشگاه فردوسی مشهد (دکتری)

3، عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی، سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران

توفو یا پنیر سویا که در واقع پروتئین های منعقد شده شیر سویا می باشد یکی از مهمترین محصولات سویا در تامین پروتئین است که بصورت تخمیری و یا غیر تخمیری می تواند مورد استفاده قرار گیرد. در تولید این محصول، مرحله انعقاد و تشکیل دلمه بیشترین تاثیر را در راندمان و بافت دارد لذا در این راستا تحقیق بر روی اثر انواع منعقد کننده ها صورت گرفت تا بیشترین تاثیر مشخص شود. بدین منظور برای انعقاد پروتئین های سویا، کواگولانت هایی چون نمک های Ca، Mg، اسید لاکتیک، آب پنیر (Whey) و مایه پنیر قارچی (MEITO) بکار گرفته شدند و اثرات هر یک با در نظر گرفتن مقدار مصرف (غلظت ماده منعقد کننده) و دمای انعقاد با هدف دستیابی به بیشترین تاثیر در بازدهی و بافت بررسی گردید تا فاکتورهای انتخاب شده مورد ازریابی قرار گیرند. در نهایت منعقد کننده $MgCL_2$ ، به عنوان بهترین عامل انعقادی به جهت ایجاد بافت منسجم و مطلوب انتخاب گردید.

کلمات کلیدی: توفو، کواگولانت، اسید لاکتیک، Whey، MEITO

Comparison of different visitors signed in preparing tofu

Taghizadeh, T. [1*], Mortazavi, A .[2] , Aziz mohseni, F.[3] , Zareh, D.[3]

1-M. Sc., Azad University – Sabzevar & Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology. tahminehtf@yahoo.com

2- Ph.D., Mashhad Ferdowsi University, Agriculture faculty, Food science.

3 - Ph.D., Biotechnology Department, Iranian Research Organization for Science and Technology.

Tofu or soy cheese that actually signed soy milk proteins are most important in providing soy protein products, which non-fermentative and fermentative can be used. In production, stage coagulation and flocculation the most effect on the efficiency and tissue, so this direction of research on signed types frequently took the most impact is specified. Concluding purpose for soy proteins, such as salts coagulant Ca, Mg, lactic acid, whey (Whey) and cheese whey yeast (MEITO) were used and effects with regard to any amounts (concentration Article signed poster) and coagulation temperature with the aim to achieve maximum effect and efficiency of tissue factor was investigated in selected persones placed. Finally signed poster MgCL2, a clotting factor to create the best integrated and optimum tissue were selected.

Keywords: tofu, Coagulant, lactic acid, Whey, MEITO.

شناسه: PH11

بررسی ماندگاری باکتری های پروبیوتیک ماست در استان خوزستان

شاکریان منصور * کثیری حاجی محمد ** موسوی سید حسین **

به ترتیب دانشجوی دکترای صنایع غذایی، کارشناس ارشد علوم دامی، دانشجوی ارشد صنایع غذایی

محل انجام تحقیق: استان خوزستان

با توجه به اثبات خواص غذاهای پروبیوتیک برای سلامتی، در یک یا دو دهه اخیر مصرف اینگونه محصولات فزونی چشمگیری یافته است. پروبیوتیک ها را می توان باکتری های زنده غذایی دانست که اثرات مفیدی در میزبان خود بوسیله ی اصلاح تعادل باکتریایی در روده بوجود می آورند. در این تحقیق از 10 بچ تولیدی ماست با استفاده از دو استارتر شامل استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و دو گونه باکتری پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریا **(B. animalis BB-12)** استفاده گردید. تعداد کلنی های پروبیوتیک در روز اول، هفته اول و تا پایان هفته چهارم مورد ارزیابی قرار گرفت.موضوع ماندگاری این گونه باکتریها تا پایان مدت مصرف که طبق تعاریف نباید از 10^7 –10^6کلنی در پایان مدت انقضاء کمتر باشد، ما را بر آن داشت تا این تحقیق انجام گیرد.شمارش تعداد باکتریها در این تحقیق طبق روش **Bile + MRS** انجام گرفت. داده ها براساس طرح آماری کاملاً تصادفی با 5 تیمار و براساس **ANOVA** مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفتند. نتایج آنالیز داده ها نشان داد که روند کاهشی با گذشت زمان در تعداد باکتری های پروبیوتیک وجود داشته و در پایان مدت انقضاء محصول (هفته چهارم) اُفت اینگونه باکتریها به اثبات رسیده و این کاهش از نظر آماری معنی دار می باشد

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، ماندگاری، استارتر، لاکتوپاسیلوس، بفیدوباکتریا

Studying the permanence of Yoghurt probiotic bacteria in Khoozestan

Shakerian, M. P.H.D student of food industries *

Kasiri, H.M farm animal sciences, M.A. **

Mosavi, S.H. M.A student of food industries **

Regarding to proving of the probiotic foods properties for the health, these products consumption have considerably increased during present one or two decades. Probiotics can be known as living food bacteria which cause useful effects in their host through bacteria balance improvement in the intestine.

The bacterias number counting was conducted based on Bile + MRS method in this research. Data was analyzed based on randomized complete statistical plan and according to ANOVA.

In this research made 10 batch of yoghurt using two starter culture including Streptococcus thermophilus and lactobacilus Bulgaricus and two Probiotic bacteria species including Lactobacilus acidophilus and Biffido bacteria (B. animalis BB-12) was applied. The probiotic colonies number was evaluated at 1,7,14,21,28 days.

The permanence of these bacteria until end of shelf life which it shouldn't be less than 10^7 colony at the end of expire time according to the definitions encouraged us to conduct this investigation.

Data analysis results showed the probiotic bacteria have had decreasing process during the time and the bacteria loss has been proved at the end of product expire time (fourth week) and this decreasing is significant from statistical view ($P<0.05$).

Key words: Probiotic, Permanence, Starter, Lactobacillus, Biffido Bacteria

شناسه: PH12

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل های با پتانسیل پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی آذربایجان

[1]علیزاده سیامک*، [2]حجازی محمد امیناسلامی صولت[3]، معصومی رضا[4]، مختاری پریا[5]**

1و2 و3و4و5- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور66Smk_alizadeh@yahoo.com

پروبیوتیک ها بعنوان مکملهای غذایی میکروبی زنده که از طریق تقویت تعادل میکروبی روده بطور سودمندمیزبان را تحت تاثیر قرار می دهند تعریف شده اند.محصولات لبنی در میان بهترین حاملهای غذایی پذیرفته شده برای کشت های پروبیوتیک قرار گرفته اند .25سویه لاکتوباسیلوس با استفاده از محیط کشت MRS آگار وگرمخانه گذاری در37 درجه سانتیگرادبه مدت 72 ساعت از محصولات لبنی جداسازی و درشرایط آزمایشگاهی برای خصوصیات پروبیوتیکی ازقبیل مقاومت به اسید وتحمل نمکهای صفراوی ارزیابی شدند. تستهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برای شناسایی ایزوله ها مورد استفاده قرار گرفت. نتايج نشان داد از 25 ايزوله جداسازي شده بعد از غربالگري اوليه در (pH,3) 21 ايزوله رشد خوبي درشرايط اسيدي (pH, 2.5) داشت. همه ايزوله هاي مقاوم به اسيد مقاومت خوبي به نمكهاي صفراوي نشان دادند در نهايت ايزوله ها در گروههاي لاكتوباسيلوس كازئي ؛ لاكتوباسيلوس فرمنتوم؛ لاكتوباسيلوس سيك ؛ لاكتوباسيلوس پلانتاروم و لاكتوباسيلوس آزيليس قرار گرفتند. مقاومت بالا به اسيد ونمكهاي صفراوي، پيشنهاد مي كند كه محصولات لبني سنتي غير پاستوريزه اين مناطق به عنوان منابع طبيعي لاكتوباسيلوس هاي با پتانسيل پروبيوتيكي است كه ميتواند بعنوان افزودني در توسعه محصولات لبني استفاده شود. تحقيقات بيشتر به منظور بررسي بقاء و سودمندي سويه ها در فرايند هضم و گوارش درميزبان انساني مورد نياز است.

كلمات كليدي: پروبيوتيک، لاكتوباسيلوس، محصولات لبني

Isolation and biochemical characterization of potentially probiotic *lactobacillus* from traditional dairy products of Azerbaijan

[1]Alizadeh Siamak*, [2]Hejazi Mohammad Amin, [3]Eslami Solat , [4]Masumi Reza, [5]Mokhtari Paria**

1,2, 3, 4, 5- Agricultural Biotechnology Research institute of Iran Northwest and West region smk_alizadeh@yahoo.com

Introduction: Probiotics have been defined as "a live microbial food supplement which beneficially affects the host by improving the intestinal microbial balance. Dairy foods are among the best accepted food carriers for probiotic cultures.

Method and materials: Twenty-five *Lactobacillus* strains of dairy origin were isolated using MRS agar incubated anaerobically at 37^{o}C for 72 hrs and evaluated in vitro for their probiotic potential with the resistance to low pH, and bile salts. Morphological, physiological and biochemical reactions were used to characterize the isolates

Results: The results showed that from 25 isolates, after primary screening at low pH (pH, 3), 21 strains grew well at acid condition (pH, 2.5). All of acid resistant isolates showed good tolerance to bile salt. . finally isolates located in *Lactobacillus casei , L.plantarum , L.sake, L. fermentum and L. agilis* groups.

Discussion: The high acid and bile resistance, suggest that unpasteurized dairy products of these region is a natural source of potentially probiotic lactobacilli, which could be used as an additive in the development of potentially probiotic products. Further work is required to demonstrate the persistence and efficacy of these strains in the human host upon ingestion.

Keywords: Probiotic, Lactobacillus, Dairy foods

شناسه: PH13

بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیلوس های موجود در محصولات لبنی سنتی شهرستان هریس با تکنیک RAPD-PCR

حاجیه لطفی*، محمد امین حجازی، ابوالفضل برزگری، بهرام ملکی زنجانی

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب وغرب کشور نویسنده مسئول Email:lotfi.hajie@yahoo.com

لاکتوباسیلوس ها از مهمترین باکتریهای اسید لاکتیک هستند که در محصولات لبنی تخمیری یافت می شوند. این باکتریها یکی از ترکیبات موجود در غذاهای فراویژه مانند موادغذایی تخمیری حاوی پروبیوتیک ها هستند که می توان به ماست پروبیوتیک اشاره کرد. بررسی فلور میکروبی لبنیات سنتی ، روابط فیلوژنتیک و تکاملی گونه های لاکتوباسیلوس با استفاده از تکنیک RAPD-PCR برای هر منطقه الزامی می باشد. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیلوسها با استفاده از تکنیک RAPD_PCR از محصولات لبنی سنتی منطقه هریس می باشد. این تحقیق بر روی 15 ایزوله جمع آوری شده از محصولات لبنی سنتی در پژوهشکده کشاورزی شمالغرب و غرب کشور انجام شد. ابتدا سویه ها با روش های بیوشیمیایی در حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند که شامل گونه های برویس، فرمنتوم، پلانتاروم، کازئی ، دلبروکی و سالیواریوس می باشند. سپس تنوع ژنتیکی آنها از نظر تفاوت در توالی ژن 16s rRNA با استفاده از تکنیک RAPD_PCR و 4 پرایمر تصادفی بررسی گردید. جدول اسکردهی باندها بر اساس ضریب صفر و یک (عدم وجود باند و وجود باند) تهیه شده و با برنامه NTSYS و روش UPGMA دندروگرام حاصل رسم گردید. در پایان نتایج ، تجزیه آماری الگوهای به دست آمده با روش RAPD_PCR نشان داد که 15 سویه لاکتوباسیلوس با ضریب تشابه 61 ٪ به سه گروه مجزا تقسیم بندی شدند. همچنین ایزوله هایی که در تست های بیوشیمیایی الگوی یکسانی داشتند با این تکنیک در گروه های جداگانه قرار گرفتند و تنوع بالای ژنتیکی ایزوله های موجود در محصولات لبنی نشان داده شد.

واژه های کلیدی : لاکتوباسیلوس ، غذاهای فراویژه، RAPD_PCR

Genetic Diversity of Lactobacilli isolated from Heris's traditional dairy products using RAPD_PCR

Lotfi H*, Hejazi M.A, Barzegari A. Maleki Zanjani B

Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, North-West and West region, Tabriz, IRAN

Email : lotfi.hajie@yahoo.com

Lactobacillus genus is the most important type of Lactic Acid Bacteria exists in fermented foods. Some strains of Lactobacillus species are used in functional foods, for example in probiotic yoghurt. The aim of the present study was to determine the genetic diversity of Lactobacillus species isolated from Heris's traditional dairy products, using RAPD_PCR. After isolation of strains from dairy products in ABRII NW institute, six species of Lactobacillus genus were identified by biochemical tests, including fermentum, brevis, plantarum, casei and salivarius. Then they were characterized using RAPD_PCR with 16s rRNA gene differentiation. Four primers were amplified randomly reproducible banding patterns. Data was clustered and analysed, using NTSYS program, UPGMA method. 15 Lactobacillus isolates were divided into 3 groups at 61 % similarity level. Although, some isolates have the same characteristics by biochemical tests, but they were separated to different groups by RAPD clustering. The result of this study demonstrates highly genetic diversity between genuses of Lactobacillus in traditional dairy products.

Key words: functional food, Lactobacillus, RAPD_PCR.

شناسه : PH14

بررسی اثر تلقیح باکتری‌های اسید لاکتیک

(*Lactobacillus. plantarum , Lactobacillus. fermentum*) بر کاهش نیتریت و بار میکروبی، در نوعی سوسیس تخمیری

[d]، فردین میراحمدی[c] ، مهناز مظاهری[b] ،شعله درویشی[a]پیمان اسماعیل زاده**

a دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران

b استادیار گروه مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، ایران

c دانشیار گروه بیوتکنولوژی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

d عضو هیئت علمی گروه مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، ایران

املاح نیتریت سدیم غالباً به عنوان نگهدارنده، آنتی اکسیدان و تثبیت کننده رنگ در محصولات گوشتی استفاده می شوند و نیتریت به عنوان یک ماده سرطانزا شناخته شده است. هدف از این تحقیق مطالعه اثرات تلقیح توسط باکتری های اسید لاکتیک در میزان کاهش نیتریت محصولات گوشتی(سوسیس تخمیری)می باشد. سه سویه *L. fermentum PTCC 1638* ,*L. plantarum PTCC 1058* و *Leu. mesenteroides subsp.mesenteroides PTCC 1563* برای بررسی توانایی کاهش نیتریت انتخاب گردیدند. دو سوش *L. plantarum* ,*L. fermentum* و مخلوط آنها، به عنوان مایه های کشت میکروبی در تولید سوسیس استفاده شده است. مایه های کشت، با تعداد معادل 10^8 cfu/gfarsh به سوسیس های حاوی 120 µg/g نیتریت، تلقیح شده است. میانگین میزان نیتریت باقیمانده، pH، اسیدیته، تعداد کل لاکتوباسیلوس ها و تعداد کل باکتری های آنتروباکتریاسه درطول دوره تخمیر و رسیدن در مقایسه با تیمار شاهد معنی دار شده است($P<0.05$). میانگین نیتریت باقیمانده در سوسیس تخمیری تلقیح شده با*L. plantarum , L. fermentum*، مخلوط، به ترتیب به میزان76/1٪، 86/6٪ و 81/9٪ کاهش یافته است، در حالیکه در تیمار شاهد این میزان کاهش، 69/3٪ بوده است. نتایج آماری نشان می دهد که تفاوت معنی داری بین میانگین تعداد کل باکتری های مزوفیل هوازی درکلیه تیمارها وجود نداشت($P<0.05$).

واژه های کلیدی: نیتریت، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوی پلانتاروم، سوسیس تخمیری

The effect of inoculation of selected lactic acid bacteria (Lactobacillus. plantarum, lactobacillus. fermentum) investigation, on the nitrite concentration and bacterial load, in topical fermented sausage.

P. Esmailzadeh [a], Sh. Darvishi [b], M. Mazahery[c], F. Mirahmadi[d]**

[a] M. Sc. Student of Food and Science Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Professor of the Department of Food and Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Iran.

[c] Associated Professor of Biotechnology Center, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran.

[d] Academic Member of the Department of Food and Technology, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Iran.

Nitrite salts of sodium have been used traditionally in meat products as preservatives, antioxidant and color fixative agents. Nitrite is highly carcinogen agent. The aim of this work was to study acid lactic bacteria inoculation effects on nitrite reduction in sausage products. Three lactic acid bacteria strains (*L. fermentum PTCC 1638 , L. plantarum PTCC 1058*, *Leu. mesenteroides subsp.mesenteroides PTCC 1563*) were selected for considering of their nitrite reduction ability primarily. Two strains of them (*L. fermentum, L. plantarum)* and their mixture were evaluated as starter cultures in the production of sausage. Mentioned strains and their mixture with finally number of (10^8cfu/g farsh) inoculated to sausage containing 120 µg/g nitrite. No significant differences (P>0.05) were recorded by pH, acidity and total number of lactic acid bacteria(TNL) in fermented sausage by *L. fermentum, L. plantarum.* Other factors such as residual nitrite and total number of Enterobacteriacea (TNE) were significantly different (P<0.05). During Fermentation and Ripening periods, nitrite residual mean value, pH, acidity, TNL and TNE were significantly different (P<o.o5) in compared to no inoculation treatment. Residual nitrite in fermented sausage by *L. fermentum, L. plantarum* and their mixture was reduced to 76.1%, 86.6% and 81.9% respectively, while it was 69.3% in no inoculation treatment. Result revealed that is no difference between total aerobic bacteria men values in all treatments (P>0.05).

Key words: Nitrite, Lactobacillus. fermentum, Lactobacillus. plantarum, fermented sausage.

شناسه : PH15

بررسی فعالیت ضدمیکروبی باکتریهای با پتانسیل پروبیوتیکی جداسازی شده از محصولات لبنی آذربایجان بر علیه پاتوژن های روده ای وغذازی

معصومی کیا رضا*1&2 ، حجازی محمد امین **2، اسلامی صولت 2،علیزاده سیامک2 ، گلابی مصطفی 2،محمدیان الهام 2

1دانشگاه دولتی باکو- آذربایجان،2 پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران-منطقه شمالغرب وغرب67 Aminhejazi@abrii.ac.ir

پروبیوتیک ها مکملهای غذایی میکروبی زنده ای هستند که زمانی که به مقدار کافی مصرف شوند می تواند اثرات سودمندی در سلامت میزبان ایفا نمایند. یکی از اثرات مفید باکتری های پروبیوتیک ،اثر ضدمیکروبی آن است . در این مطالعه هدف بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری های با پتانسیل پروبیوتیکی ،جداسازی شده از محصولات لبنی مناطق آذربایجان می باشد آزمایش شده است. در این تحقیق طیف بازدارندگی محلول روئی 86 سویه باکتری لاکتیک اسید با استفاده از روش disc diffusion مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی فعا لیت بازدارندگی بر علیه پاتوژن های روده ای وباکتری های پاتوژن با منشا غذایی شامل 7 سویه گرم منفی ومثبت شامل *Escherichia* PTcc1399 *Yersinia Enterocolitica* 1159 , *Listeria* DSM20649 , *Bacillus subtilis,* ، *Staphylococcus aureus* 431 *klabsiella* و *Shigella flexneri* به عنوان اندیکاتور مورد استفاده قرار گرفت .از 86 سویه باکتری لاکتیک اسید، 34 ایزوله جداسازی شده اثر بازدارندگی بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. قطر هاله عدم رشد بین 8 تا 16 میلی متر تعیین شد. سویه لاکتوباسیلوس سیک طیف بازدارندگی وسیعی بر علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نشان داد که از این میان بیشترین هاله عدم رشد مربوط به اندیکاتور klabsiella با 16 میلی متر قطر تعیین شد. نتایج این تحقیق نشان می دهد که باکتری های بومی لاکتیک اسید جداسازی شده از محصولات لبنی دارای پتانسیل ضد میکروبی هستند واز این طریق می توانند نقش بسزایی در سلامت غذاهای تخمیری ومیزبان ایفا کنند.

کلمات کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی،پروبیوتیک

Antimicrobial Activities of potentially probiotic Bacteria Isolats from dairy products of Azerbaijan against enteric and food-born pathogens

Masoumikia reza*1&2, Hejazi mohammad amin2 ,eslami solat2, Alizadeh siyamak2,**

golabi mostafa2 , Mohammadian elham2

1Baku stats university,Azerbaijan ,2 Agricultural biotechnology research institute of Iran,Tabriz,I.R.Iran
Aminhejazi@abrii.ac.ir

Introduction : Probiotics have been defind as 'Live microorganisms confer a health benefit on the host when administered in adequate amounts'. This study aimed to characterize the antimicrobial activities of potentially probiotic lactic bacteria originated from dairy product of Azerbaijan province.

Material and method :The inhibitory spectrum of culture supernatants of 86 lactic acid bacteria strains were assayed by the disc diffusion method. The inhibitory activity was evaluated against enteric and food-born pathogen including 7 strains *Staphylococcus aureus* 431*, Escherichia* PTcc1399, *Yersinia Enterocolitica* 1159, and *Listeria Innocua* DSM20649 and *Bacillus subtilis, klabsiella* and shigella flexneri.

Results **:** 34 isolates showed antibacterial effect against Grampositive and Gramnegetive bacteria. The inhibition diameters obtained with bacteriocin were between 8 mm and 16 mm. Grampositive and Gramnegetive bacteria indicator bacteria were most inhibited. Lactobacillus sake k3 strain showed the widest inhibitory spectrum against the Gram positive and Gram negetive bacteria.

Discussion : This preliminarily work shows the potential application of autochthonous lactic bacteria to improve safety of traditional fermented food.

Key words: Antimicrobial activity, probiotic

شناسه: PH16

جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس های دارای پتانسیل پروبیوتیکی از ماست و پنیر سنتی شهرستان کلیبر

اسلامی صولت[1]- حجازی محمد امین[1] – ابراهیمی تاج آبادی مریم[2]- ابراهیمی پور غلامحسین[2]**

1- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور

2- دانشگاه شهید بهشتی تهران- دانشکده علوم زیستی

لاکتوباسیلوس های پروبیوتیک در حال حاضر در تعدادی از محصولات لبنی استفاده می شوند. هدف از این مطالعه جداسازی لاکتوباسیلوس های دارای پتانسیل پروبیوتیکی از ماست و پنیر خانگی بود.

جمعیت میکروبی هر محصول لبنی کشت داده شده در محیط MRS به بافر PBS(pH=3 به مدت 2/5ساعت) منتقل شد. ایزوله های انتخاب شده برای تعیین درصد بقاء شان در بافرPBS (با pH=2/5 به مدت 3 ساعت) دوباره آزمایش شدند. بعد، تاخیر رشد آنها در حضور نمک های صفراوی 0.3 درصد تعیین شد. ایزوله های انتخاب شده بوسیلهٔ روشهای فنوتیپی شناسایی و برای مطالعات بعدی نگهداری شدند. 25 لاکتوباسیلوس مقاوم به اسید در مرحلهٔ غربال گری اولیه جدا شدند. در میان آنها، 17 ایزوله درصد بقاء بالاتر از 50 درصد را در 2/5 =pHبه مدت 3 ساعت نشان دادند. 17 ایزولهٔ انتخاب شده بر اساس میزان مقاومت به نمک های صفراوی گروه بندی شدند. از 17 ایزوله، 8 ایزوله بطور دلخواه به عنوان متحمل (تاخیر رشد بین 15 تا 45)، 5 ایزوله به عنوان متحمل ضعیف (تاخیر رشدی از 45 تا 60 دقیقه) و 4 ایزوله به عنوان حساس (تاخیر رشد بالاتر از 60دقیقه) گروه بندی شدند. با استفاده از روشهای فنوتیپی ایزوله های لاکتوباسیلوسی به عنوان لاکتوباسیلوس دلبروکه ای، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس دایورژنز و لاکتوباسیلوس برویس شناخته شدند. با در نظرگیری تحمل pH پائین و نمکهای صفراوی، تنوع بالایی در میان ایزوله ها دیده شد. روی هم رفته، ایزوله های لاکتوباسیلوس دلبروکی نسبت به ایزوله های دیگر به نمک های صفراوی حساس تر بودند.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس – پروبیوتیک- مقاومت به اسید و نمک های صفراوی – غربال گری

Isolation and characterization of potential probiotic lactobacillus from homemade yoghurt and cheese of kaleybar

Eslami Solat[1], Hejazi Mohammad Amin*[1], ebrahimi taj abadi maryam, ebrahimi Ebrahimipour Gholamhossein[2]**

1- Agriculture biotechnology research institute northwest and west of Iran

3. Faculty of biology Science, Shahid beheshti, tehran

Probiotic lactobacilli are currently used in numerous yoghurt and other dairy products. The aim of this study was to isolate potentially probiotic lactobacilli from homemade yoghurt and cheese.

For rapid screening of acid-resistant lactobacilli and avoiding preliminary and time-consuming isolation steps, microbial population of each dairy product culture in MRS broth was transformed to PBS buffer (pH=3 for 2.5 h). Selected isolates were further characterized by determination of their survival percentage in PBS buffer (pH=2.5 for 3 hr). Afterwards, their growth delay in the presence of 0.3% bile salts was determined. The acid and bile tolerant isolates were identified by phenotypic methods and preserved for further studies.

Twenty five acid-resistant lactobacilli were isolated in the first rapid screening step. Among them, 17 isolates showed survival rate of >50% at pH 2.5 for 3 h. 8 isolates out of the 17 were slightly affected by 0·3% bile salts, showing 10-25 min delay of growth comparing with the growth in the control cultures. five isolates showed 40-60 min delay of growth and four isolates showed growth delay of >60 min. out of 17 isolates, 8 could be arbitrarily classified as tolerant (15 min $< d \leq$ 40 min), five as weakly tolerant ($40 < d < 60$) and four as sensitive ($d > 60$). Using phenotypic methods Lactobacillus isolates were identified as Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus casei, Lactobacillus divergenes and Lactobacillus brevis.

We found high variation among the isolates regarding bile and Low pH tolerance. Altogether isolates of Lactobacillus delbrueckii appeared to be more sensitive to bile than the other isolates.

Key words: Lactobacillus – probiotic – resistance to acid and bile salts - screening

شناسه: PH17

تأثیر pH ماست بر قابلیت بقای پروبیوتیک‌های آن

***جعفرپورصادق فرناز،**همایونی‌راد عزیز، جوادی مینا، ذاکری نازنین**

دانشگاه علوم پزشکی تبریز-دانشکده بهداشت‌وتغذیه-گروه علوم و صنایع غذایی

69Homayounia@tbzmed.ac.ir 70 & Farnaz.Jafarpour@yahoo.com

مقدمه: موادغذایی حامل پروبیوتیک‌ها یعنی غذای فراسودمند (فراویژه یا عملگر)، غذایی است که علاوه بر ویژگی تغذیه‌ای دارای ویژگی سلامت بخش برای مصرف کننده باشد. همه تعاریف انجام شده از پروبیوتیک‌ها،بر زنده مانی این باکتری‌ها تأکید می‌کنند. باکتری‌های پروبیوتیک نه تنها بایستی در طول مدت زمان ماندگاری غذا زنده بمانند، بلکه می‌بایست در طول عبور از اسید معده، آنزیم‌ها و نمک‌های قلیایی صفراء زنده مانده و به محل فعالیت خود (روده) برسند. روش کار:تعداد 3 نمونه در هر روز انتخاب شدکه یکی از آن‌ها بلافاصله از-خط تولید و نمونه دیگر 2 ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری (دمای 45-43) از همان بسته و نمونه بعدی بلافاصله قبل از قرار دادن آن‌ها در سردخانه تهیه شد، نمونه گیری در 3 روز انجام شد. pH و اسیدیته و تعداد پروبیوتیک های نمونه ها در هر مرحله اندازه گیری و شمارش شد. هدف: در این مطالعه تأثیر pH ماست بر قابلیت بقای پروبیوتیک‌های آنبررسی شد. نتیجه و بحث تحقیق: نتایج حاصل از بررسی نمونه هایی که بلافاصله از خط تولیدانتخاب شدند نشان دهنده pH حدود 6.52 و اسیدیته پایین و همچنین تعداد کم پروباکترهای شمارش شده بود در ادامه نمونه‌های مربوط به حدود 2.5 ساعت بعد pH کاهش و اسیدیته افزایش یافت امّا تعداد باکتری ها چندان افزایش نیافته بود. در نهایت پس از بررسی یافته های حاصل از نمونه آخر که بلافاصله قبل از قرار دادن در سردخانه انتخاب شدند کاهش pH و افزایش اسیدیته به صورت چشمگیر مشاهده شد و تعداد باکتری شمارش شده افزایش یافته بود. فقط تعداد آن ها در رقت 4 برای قابل قبول بودن شمارش پلیت مناسب بود و در رقت 6 تهیه شده باکتری‌ها قابل شمارش نبودند زیرا یا اصلاً رشد نکرده بودند و یا تعدادشان کم بود، بنابراین روند طی شده pH کاهشی و اسیدیته و تعداد باکتری ها با گذشت زمان افزایشی و منطقی بوده و بعد از رسیدن به pH واسیدیته مشخصی که باید ماست‌ها از گرمخانه خارج شوند باکتری های شمارش شده در حد مقدار استاندارد بودند امّا تعداد آن ها بیانگر این مسئله بود که باید توجّه زیادی در شرایط مربوط به کشت مصرفی، مدت و زمان گرمخانه وسردخانه گذاری و همینطور در مراحل بعدی حفظ زنجیره سرما به نحواحسنت صورت گیرد تا با تعداد مناسب به مصرف کننده برسد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، ماست، قابلیت زیستی

Evaluation the effect of pH on probiotic survival in yoghurt

Jafarpour Sadegh, Farnaz*, Homayouni Rad, Aziz and Javadi, Mina, Zakeri Nazanin**

Farnaz.Jafarpour@yahoo.com & Homayounia@tbzmed.ac.ir

Department of Food Science and Technology, Faculty of Health and Nutrition, Tabriz University of Medical Sciences.

Food products containing probiotic bacteria are belong to functional foods. Functional foods have therapeutic value in addition to their nutritive value. In these foods, the probiotics should be surviving the production and storage period and also could survive against harsh conditions of gastrointestinal tract (acidic and alkaline). Three samples of pro-yoghurt were selected from the production line in different steps (immediately after packaging, 2 hours after incubation at 44°C and before cold storage). The pH value, acidity and the number of probiotics were evaluated to determine the effect of pH on the probiotic survival. All experiments were conducted in triple. Results were shown that the pH value was decreased in the mentioned steps but the acidity was increased. The probiotic count was increased at the end of incubation time. The final number of probiotic was 7×10^5 CFU/gr. So, the amounts of probiotic starter culture, incubation time and next cold chain distribution system are very important for maintaining the suitable number of probiotics in the pro-yoghurt.

Key words: probiotic, yoghurt, survival.

شناسه: PH18

جداسازی و شناسایی میکروارگانیزم پروبیوتیک عامل تخمیر در تولید سبزیجات تخمیری رژیمی

معماریان، نیلوفر*[1]**؛ عزیزی، اصلان[2]؛ بازیار، بهزاد[3]

دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،

دانشیار علوم و صنایع غذایی و عضو هیات علمی موسسه تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی کرج، aslan_azizi@yahoo.com

استادیار و عضو هیات علمی گروه صنایع چوب و کاغذ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران،

محصولات تخمیری قرن هاست که دردنیا وجودداشته و به علل و روشهای مختلف و با فن آوری های متنوعی تولید می گردند. تخمیر به عنوان روشی برای نگهداری مواد غذایی، مجموعه ای از تغییرات شیمیایی قابل ملاحظه ای است که در مواد اولیه مختلف به وسیله میکروب های مختلف به وجود آمده و باعث افزایش ارزش غذایی فرآورده می گردد. در عین حال بدون تردید، اغلب انسانها در جوامع مدرن و شهری، بسیار بیشتر از نیازهای فیزیولوژیک خود نمک مصرف می کنند. از آنجایی که دریافت میزان بالای نمک با افزایش فشار خون و بیماری های قلبی و عروقی در ارتباط است، توصیه های تغذیه ای بیشماری در جهت کاهش مصرف نمک از سوی متخصصان وجود دارد. در این پژوهش دو سبزی مهم که از نظر خواص سلامت بخشی بی نظیر بوده و در کشور ما نیز به وفور یافت و کشت می گردند، مورد بررسی و تخمیر لاکتیکی قرار گرفتند. در حال حاضر از این دو ماده اولیه، شورهای سنتی به وفور تهیه می گردد که نشان دهنده گرایش بالای مصرف کنندگان به این دو سبزی می باشد. با استفاده از از دو سبزی گل کلم وهویج همراه با گیاه شوید و گیاه نعناع، و با به کارگیری 5 غلظت متفاوت نمک شامل غلظت های 3، 3/5، 4، 4/5 و 5 درصد، 5 تیمار تخمیری مختلف حاصل آمد. به منظور شمارش میکروارگانیزم های عامل تخمیر، در زمان های 1، 2، 3 و 4 روز پس از شروع تخمیر، از تمام تیمارها نمونه برداری شده و کشت میکروبی در محیط های کشت MRS آگار و LSDM آگار انجام گرفت و به موازات آنها pH تیمارها نیز اندازه گیری گردید. جداسازی و انجام آزمون های شناسایی ریززنده ها بعد از گذشت 24، 48 و 72 ساعت از تخمیر روی تیمار حاوی گل کلم، هویج، گیاه شوید و نعناع با 3 درصد نمک انجام گرفت. مشاهده گردید که در ابتدای تخمیر و در حقیقت در بحرانی ترین مرحله آن، میکروارگانیزم *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که یک میکروارگانیزم پروبیوتیک می باشد، قابل جداسازی و شناسایی می باشد. پس ازگذشت 4، 15 و 30 روز

از شروع تخمیر نیز آزمون های شیمیایی اندازه گیری pH و ویتامین ث انجام گردید، که در تیمار تحت آزمون، با کاهش pH، ویتامین ث گل کلم و همچنین هویج افزایش یافته و به ترتیب از 54/58 و 8/33 به 68/18 و 12/43 پس از 30 روز از شروع تخمیر رسید. تمام نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS و به کارگیری روش تجزیه واریانس داده ها و گروه بندی دانکن مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفته ومعنی دار بودن متغیرها در سطح 5 درصد بررسی گردید. در نهایت مشخص گردید که تخمیر سبزیجات گل کلم و هویج، تحت شرایط کنترل شده به وسیله میکروارگانیزم های متفاوت و به طور ویژه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* میسر بوده و افزایش ارزش غذایی فرآورده را نیز به دنبال داشت.

واژه های کلیدی: گل کلم و هویج. تخمیر. شناسایی میکروارگانیزم ها. اندازه

Isolation and identification of Fermentative Probiotic Microorganism in the Production of Dietary Fermented Vegetables

Memarian, Niloofar *،[1]; Azizi, Aslan[2]; Bazyar, Behzad[3]**

1. M.Sc. student in Food Sciences, Azad University, Tehran Science and Research, niloofar1891@yahoo.com
2. Associate Professor of Food Sciences and faculty member of Agricultural Engineering Research Institute, Karaj, aslan_azizi@yahoo.com
3. Assistant Professor and faculty member of wood and paper industry group Islamic Azad University, Tehran Science and Research, behzad1351@yahoo.com

The fermented products are produced for centuries by different methods and various technologies. Fermentation as a way to maintain foods is a series of considerable chemical changes which is caused in different raw materials by different microbes and increases the value of food products. However, without doubt, most people in modern urban communities consume much more salt than physiological needs. Since the receiving high level of salt is associated to increase blood pressure and cardiovascular diseases, there are many nutritional recommendations to reduce salt consumption.

In this study, two important vegetables which are unique in healthy properties and are also cultivated in our country were fermented by lactic fermentation. Currently, traditional pickles are abundantly produced with these two vegetables that show the high trends of consumers to them.
By using cauliflower, carrot, dill and mint plant and also the 5 different salt concentrations, including 3, 3.5, 4, 4.5, and 5 percent, 5 treatments were produced. Counting of microorganisms was done in MRS agar and LSDM agar media by use of all treatments after 1, 2, 3, and 4 days. Measuring of pH was held as well. Identifications of microorganisms were also done 24, 48 and 72 hours after fermentation by means of the treatment which was contained cauliflower, carrot, dill and mint with 3 percent salt.

It was observed that at the beginning of the fermentation and in fact the most critical stage, *Lactobacillus plantarum* which is a probiotic microorganism, was able to isolate and identify. After 4, 15 and 30 days of the beginning of fermentation, chemical analyses were performed to measure pH and Vitamin C. It was observed that in the investigated treatment, reducing the pH, vitamin C content of cauliflower and carrot, respectively, increased from 54.58 and 8.33 to 68.18 and 12.43 after 30 days of fermentation. All measuring statistical analyses were done by means of SPSS software and variance analysis procedure and Duncan classification ($p<0.05$).

Finally it was determined that fermenting of cauliflower and carrots, under controlled conditions by different microorganisms and especially *Lactobacillus plantarum* was possible and also increased value of food products.

Keywords: Cauliflower and Carrot. Fermentation. Identification of Microorganisms. Measuring Vitamin C. Low-Salt Pickle.

شناسه: PH19

بررسی تنوع ژن 16s rDNA لاکتوباسیلوس های موجود در محصولات لبنی سنتی منطقه کلیبر ، اهر و ماکو آذربایجان با استفاده از تکنیک ARDRA

مختاری زنوزی پریا*[1]، حجازی محمد امین **[2]، برزگری ابوالفضل [2]، لطفی حاجیه [2]، علیزاده سیامک[2]

[1] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

[2] پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور، تبریز، ایران

یکی از منابع مهم باکتریهای اسید لاکتیک محصولات لبنی تخمیری مانند ماست و پنیر سنتی می باشد . لاکتو باسیلها از مهم ترین جنس های شناخته شده باکتری های اسید لاکتیک در تولید ترکیبات معطر و ایجاد طعم و مزه در محصولات لبنی هستند. این باکتری ها متداولترین نوع باکتری هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک معرفی می شوند. هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژن 16s rDNA لاکتو باسیلوسهای موجود در لبنیات سنتی به روش ARDRA[1]21 می باشد. این تحقیق بر روی 30 ایزوله جمع آوری شده از محصولات لبنی سنتی از منطقه آذر بایجان شرقی در پژوهشکده بیو تکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور با استفاده از روش ARDRA انجام شد . این تکنیک بر اساس تکثیر ژن ریبوزومال باکتری و انجام برش آنزیمی استوار می باشد که تفاوت الگوی برش آنزیمی این ژن نشان از تنوع گونه ای باکتری می باشد.ابتدا برای تایید جنس ایزوله ، تکثیر قطعه توسط پرایمر های اختصاصی ژن 16S rDNA طراحی شده برای جنس لاکتوباسیل انجام گرفت سپس از 2 آنزیم برشی *Ta*qI و *Ms*pI که بر اساس جایگاه برشی موجود در توالی های ثبت شده در Gene bank انتخاب شده بود برای هضم آنزیمی و بررسی ایزوله ها در حد گونه استفاده شد . الگوی نواری حاصل از برش آنزیمی با الگوی نواری به دست آمده از نرم افزار Gen doc مقایسه شد. باند حا صله در واکنش PCR به اندازه 1500 جفت نوکلئوتید بود که با اندازه ژن مطابقت دارد. آنالیز ها نشان داد که لاکتو باسیلوس های جدا سازی شده الگوی برشی مشابهی را با لاکتو باسیلوس های پلانتاروم، فرمنتوم، کازئی، سیک و آژیلس دارند. با توجه به اینکه حجم نمونه زیادی برای بررسی دقیق تنوع گونه ای لازم می باشد و آماده سازی و توالی یابی این حجم نمونه هزینه بر و زمان بر می باشد لذا جهت رفع این مشکل می توان از روش ARDRAاستفاده نمود. نتایج این تحقیق نشان داد که این روش از کارایی لازم جهت تعیین گونه برخوردار می باشد

واژه های کلیدی ARDRA، لاکتو باسیلوس، محصولات لبنی

Investigation of genetic diversity in traditional dairy products in Kaleiber , Ahar , Maku in Azarbaijan region based on 16S rDNA gene using ARDRA technique .

Mokhtari zonuzi Paria *[1], Hejazi Mohammad amin **[2], Barzegari Abolfazl [2], Lotfi Hajie [2], Alizadeh Siamak

[1] Islamic Azad Univercity .Tehran .Iran

[2] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran Northwest and West region .Tabriz . Iran

One of the most important sources of lactobacilli is dairy fermentation products including traditional yoghurt and cheese. Lactobacillus is known as significant genes of bacteria which can produce aromatic compositions and create taste and flavour in dairy product.These bacteria are the most common type of microbes used as probiotic. The aim of this research is to study genetic diversity of 16S rDNA in lactobacilli present in traditional dairy , using ARDRA method. This method is based on amplified ribosomal DNA restriction analysis that differencies in restriction pattern of the gene suggests the diversity of bacterial species.

this research was carried out on 30 isolates collected from traditional dairy products of eastern Azarbaijan in agricultural biotechlology research institute of iran northwest and west region. Initially , amplification of 16S rDNA fragment was performed with species-specific primers . the size of the amplified band in PCR was about 1500 bp. ARDRA method was utilized for investigation of sequence differences in 16S rDNA gene of the isolates.thereupom 2 restriction enzymes of Msp I , Taq I were used on the corresponding sequences registered at Gen bank. Restricted fragments of our isolates were compared with those of registered strains (oa data bank) using Gene Doc program.

the analysis indicated that the isolated lactobacilli show similar restriction patterns to those of lactobacillus plantarum ,L. fermentum , L. casei , L. sake,L.

the comparison of the results showed that ARDRA technique is a rapid and inexpensive method for investigation of genetic diversity and identification of different species.

Key words : ARDRA , lactobacillus , traditional dairy products.

شناسه: PH20

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل های با پتانسیل پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی آذربایجان(اهر و ماکو)

[1]علیزاده سیامک*، [2]حجازی محمد امیناسلامی صولت[3]، معصومی رضا[4]، مختاری پریا[5]**

1و2 و3و4و5- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور72Smk_alizadeh@yahoo.com

پروبیوتیک ها بعنوان مکملهای غذایی میکروبی زنده که از طریق تقویت تعادل میکروبی روده بطور سودمندمیزبان را تحت تاثیر قرار می دهند تعریف شده اند.محصولات لبنی در میان بهترین حاملهای غذایی پذیرفته شده برای کشت های پروبیوتیک قرار گرفته اند .25 سویه لاکتوباسیلوس با استفاده از محیط کشت MRS آگار وگرمخانه گذاری در37 درجه سانتیگرادبه مدت 72 ساعت از محصولات لبنی جداسازی و درشرایط آزمایشگاهی برای خصوصیات پروبیوتیکی ازقبیل مقاومت به اسید وتحمل نمکهای صفراوی ارزیابی شدند. تستهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برای شناسایی ایزوله ها مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد از 25 ایزوله جداسازی شده بعد از غربالگری اولیه در (pH,3) 21 ایزوله رشد خوبی درشرایط اسیدی (pH, 2.5) داشت. همه ایزوله های مقاوم به اسید مقاومت خوبی به نمکهای صفراوی نشان دادند در نهایت ایزوله ها در گروههای لاکتوباسیلوس کازئی ؛ لاکتوباسیلوس فرمنتوم؛ لاکتوباسیلوس سیک ؛ لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس آژیلیس قرار گرفتند.مقاومت بالا به اسید ونمکهای صفراوی، پیشنهاد می کند که محصولات لبنی سنتی غیر پاستوریزه این مناطق به عنوان منابع طبیعی لاکتوباسیلوس های با پتانسیل پروبیوتیکی است که میتواند بعنوان افزودنی در توسعه محصولات لبنی استفاده شود. تحقیقات بیشتر به منظور بررسی بقاء و سودمندی سویه ها در فرایند هضم و گوارش درمیزبان انسانی مورد نیاز است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، محصولات لبنی

Isolation and biochemical characterization of potentially probiotic *lactobacillus* from traditional dairy products of Azerbaijan (Ahar and Maku)

[1]Alizadeh Siamak*, [2]Hejazi Mohammad Amin, [3]Eslami Solat , [4]Masumi Reza, [5]Mokhtari Paria**

1,2, 3, 4, 5- Agricultural Biotechnology Research institute of Iran Northwest and West region

Introduction: Probiotics have been defined as "a live microbial food supplement which beneficially affects the host by improving the intestinal microbial balance. Dairy foods are among the best accepted food carriers for probiotic cultures.

Method and materials: Twenty-five *Lactobacillus* strains of dairy origin were isolated using MRS agar incubated anaerobically at 37^{o}C for 72 hrs and evaluated in vitro for their probiotic potential with the resistance to low pH, and bile salts. Morphological, physiological and biochemical reactions were used to characterize the isolates

Results: The results showed that from 25 isolates, after primary screening at low pH (pH, 3), 21 strains grew well at acid condition (pH, 2.5). All of acid resistant isolates showed good tolerance to bile salt. . finally isolates located in *Lactobacillus casei , L.plantarum , L.sake, L. fermentum and L. agilis* groups.

Discussion: The high acid and bile resistance, suggest that unpasteurized dairy products of these region is a natural source of potentially probiotic lactobacilli, which could be used as an additive in the development of potentially probiotic products. Further work is required to demonstrate the persistence and efficacy of these strains in the human host upon ingestion.

Keywords: Probiotic, Lactobacillus, Dairy foods

شناسه :PH 21

بررسی خواص پروبیوتیک باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از

میکروتای روده در ماهی

لاله یزدانپناه گوهرریزی[1] ، سیمین یزدانپناه[2]

عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان و عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد کرمان

عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد کرمان

هدف از این مطالعه ارزیابی قابلیت و توانایی 3 باکتری اسید لاکتیک (LAB) جدا شده از ماهی (لاکتوکوکوس لاکتیس ، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوس) در ممانعت از چسبندگی چندین پاتوژن ماهی (آیروموناس هیدروفیلا ، آیروموناس سالمونیسیدا ، یرسینا روکری و ویبریو آنگویلاروم) به انگلهای موکوس روده ای تحت شرایط In vitro بود. نتایج نشان داد که فقط لاکتوکوکوس لاکتیس در تمامی پاتوژنهای ماهی تولید چسبندگی می کند . در حالیکه لاکتوباسیلوس پلانتاروم چسبندگی آیروموناس هیدروفیلا و سالمونیسیدا را کاهش میدهد . به غیر از ویبریو آنگویلاروم چسبندگی تمام پاتوژنهای ماهی توسط باکتری l.Fermentum و از طریق میکس 3 سویه LAB به شدت کاهش می یابد. به علاوه فقط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس زمانیکه در محیط مایع شمارش گردید فعالیت های آنتی باکتریال بر علیه تمام پاتوژنهای ماهی را نشان داد. همه سویه های باکتری اسید لاکتیک (LAB) قادر بودند در pH پایین و غلظت بالای صفرای ماهی زنده بمانند .

کلید واژه ها : پروبیوتیک – باکتریهای اسید لاکتیک – میکروبیوتای روده – ماهی

Study of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish

Laleh yazdanpanah goharrizi , S.yazdanpanah

The aim of this study was to evaluate the ability of three lactic acid bacteria (LAB) isolated from fish,

Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, and Lactobacillus fermentum to inhibit adhesion of several fish pathogens (Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida, Yersinia ruckeri and Vibrio anguillarum) to host intestinal mucus under in vitro conditions. The results showed that only Lc. Lactis reduced the adhesion of all fish pathogens, whereas L.plantarum reduced the adhesion of A. hydrophila and A. salmonicida. With the exception of V.anguillarum, the adhesion of all fish pathogens to intestinal mucus was reduced by L. fermentum and by mixture of the three LAB strains. In addition, only Lc. lactis showed antibacterial activities against all fish pathogens as measured in spent culture liquid. All LAB strains were able to survive relatively low pH and high fish bile concentrations.

Key word **:**Probiotic- lactic acid bacteria – intestinal microbiota- fish

شناسه: PH22

غربال کردن برخی لاکتیک اسید باکتری ها بومی ایرانی بر اساس توانایی باند شدن با آفلاتوکسین M_1 وبررسی قدرت آفلاتوکسین زدایی در محیط غذایی شیر فراحرارت دیده

[1]تاج آبادی ابراهیمی مریم [**]-[2]شریفان انوشه-[3]هاشمی مریم -[4]کریمی دستجرد عاطفه [*]

استادیار ، استادیار ، استادیار ، دانشجو کارشناسی ارشد Atefeh.karimi64@gmail.com

موادغذایی مختلفی از جمله شیر و محصولات لبنی امکان آلودگی با آفلاتوکسین را دارند، که حتی در مقادیر کم، اثرات سویی بر روی سلامت انسان و حیوانات میگذارند.میکروارگانیسم های متعددی گزارش شده اند که توانایی باند شدن یا تخریب آفلاتوکسین را در موادغذایی و خوراک دارا می باشند. در این تحقیق توانایی باند شدن برخی لاکتیک اسید باکتری ها،لاکتوباسیل های بومی ایرانی که از محصولات لبنی ایزوله شده اند، با آفلاتوکسین M_1 مورد بررسی قرار گرفته است. به منظور غربال کردن وانتخاب بهترین سوش ها با توانایی بالا از تست ELISA استفاده شده سپس سوش های انتخابی را به شیر فراحرارت دیده آلوده به آفلاتوکسین اضافه کرده و میزان آفلاتوکسین باند نشده با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا اندازگیری میشود. آفلاتوکسین M_1 استاندارد به عنوان آنتی ژن و لاکتیک اسید باکتری ها به عنوان آنتی بادی در چاهک های اضافه می شوند در دمای اتاق به مدت 60 دقیقه در تاریکی گرمخانه گذاری می شوند.بعد از مرحله شستشو آفلاتوکسین باند نشده حذف شده و به دنبال آن 50 میلی لیتر از هر یک از مواد اوره پراکسیدان و کروموژن به چاهک ها اضافه شده و به مدت 30 دقیقه در تاریکی گرمخانه گذاری میشود.واکنش با اضافه کردن 100لیتر از اسیدسولفوریک 1مولار خاتمه می یابد. لاکتوباسیل هایی که نتیجه بهتری نشان دادند در محیط غذایی شیر مورد آزمایش قرار می گیرند.شیر فراحرارت دیده آلوده به آفلاتوکسین M_1 برای این منظور استفاده شده و نتیجه با کروماتوگرافی مایع با کارآرایی بالا بررسی می شود.باند شدن بین آفلاتوکسین و لاکتیک اسید باکتری ها برگشت پذیر است، با تکرار شستشو آبی آفلاتوکسین می توانند آزاد شود.این

تحقیق توانایی سوش های خاصی از لاکتیک اسید باکتری ها را در باند شدن با آفلاتوکسین نشان میدهد،که می تواند به عنوان روشی بیولوژیکی در حذف و کنترل آفلاتوکسین در محصولات لبنی مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی:آفلاتوکسین M_1، لاکتوباسیل،لاکتیک اسید باکتری، ELISA، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

Screening some Iranian Native lactic acid bacteria for their ability to bind aflatoxin M and evaluation of aflatoxin binding ability in UHT milk

[1]Tajabadi Ebrahimi Maryam[**]-[2]Sharifan Anooshe-[3]Hashemi Maryam-[4]Karimi Dastjerd Atefeh*

Various food commodities including milk and dairy products may be contaminated with aflatoxins, which, even in small quantities, have detrimental effects on human and animal health. Several microorganisms have been reported to bind or degrade aflatoxins in foods and feeds. This research assessed the binding ability of lactic acid bacterial (lactobacilli) that have been isolated from Iranian dairy products, to aflatoxin M1

(AFM1).We use ELISA kit for selected the best strains and then the selected strains are used to analyze binding ability in UHT milk that has been contimated by AFM1. Bacteria and AFM1 were incubated (24 h, +37°C) and the amount of unbound AFM1 was quantities by HPLC.

The AFM1 standards were added to wells of a micro-titer plate precoated with antibodies for AFM1 (lactic acid bacteria) and incubated at room temperature in the dark for 60 min.

After a washing step, the unbound conjugate was removed during washing. Subsequently, 50 lL each of substrate (urea peroxidase) and chromogen (tetramethylbenzidine) were added to the wells and incubated for 30 min in the dark. The reaction was stopped by adding 100 lL of 1M H2SO4.Samples showed best results were selected to used in contaminated UHT milk with AFM1 and analyzed by HPLC with Fluorescence detector. Binding was reversible, and AFM1 was released by repeated aqueous washes. These finding support the ability of specific strains of lactic acid bacteria to bind selected dietary contaminants.

(Key words: aflatoxin M, lactobacilli, Lactic acid bacteria, ELISA, HPLC)

شناسه: PH23

غنی سازی پروبیوتیکی نوشیدنی میوه ای بر پایه لبنی تحت شرایط تخمیری و غیر تخمیری با استفاده از میکروارگانیسم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم

سمیعه پورآگاهی*_محمد رضا فاضلی**

*.دانشجوی دکتری تخصصی(Ph.D.) ،کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

**.دانشیاررشته میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده داروسازی، گروه کنترول دارو و غذا

دانشگاه علوم پزشکی تهران ، دانشکده داروسازی، گروه کنترول دارو و غذا

پروبیوتیک‌ها به میکروارگانیسم‌های زنده یا میکروبهای زنده‌ای اطلاق می‌شود که ضمن برقراری توازن در فلور میکروبی روده و معده، جلوگیری یا کاهش طیف زیادی از بیماریهای عفونی را از طریق افزایش ارتقاء سلامتی میزبان موجب می‌گردند،باتوجه به اینکه غنی سازی پروبیوتیکی یکی از روشهای کاربردی و نیزصنعتی تولید محصولات غذایی تخمیری محسوب میگردد در راستای تأمین هدف فوق وایجاد غذایی ایمن"safety food"غنی‌سازی پروبیوتیکی آبمیوه«نوشیدنی میوه‌ای بر پایه لبنی» توسط لاکتوباسیلوس فرمنتوم Lactobacillus (Fermentum) صورت پذیرفت

به منظور غنی‌سازی نوشیدنی پروبیوتیک شده، پس از طی 48 ساعت انکوباسیونمیکروارگانیسم پروبیوتیک لاکتوباسیلوس فرمنتوم، به ارلنهای حاوی 100 میلی لیتر نوشیدنی تجاری میوه ای بر پایه لبنی (پگاه)، تلقیح سه رقت متفاوت (102-104-106cfu/ml)ازکشت تازه لاکتوباسیلوس در سه دمای متفاوت (آزمایشگاه، یخچال، انکوباتور)،انجام پذیرفت دردو حالت عدم فرمانتاسیون(سه رقت متفاوت)و فرمانتاسیون (102 cfu/ml)بدلیل ارزش افزونترو عدم تفاوت بارز با بیشترین رقت) پروبیوتیک شدن نوشیدنی انجام پذیرفت و تعداد کلنی حاصل (cfu/ml)، ماندگاری وPH نوشیدنی‌درهردوحالت توسط روشSerial Dilution طی 90 روز مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل حاکی از آن بود که ماندگاری نوشیدنی پروبیوتیک در حالت فرمانتاسیون نسبت به عدم فرمانتاسیون بیشترگردید؛ ضمن اینکه کلیه فرآورده‌ها در دمای انکوباتور سریعتر از دو دمای دیگر (آزمایشگاه و یخچال)از بین رفت :(41-47-57)روز به ترتیب در سه رقت متفاوت (102-104-106cfu/ml)؛دردمای یخچال بیشترین ماندگاری و بالاترین توده سلولی در هر میلی‌لیتر نوشیدنی پروبیوتیک (108 cfu/ml) حاصل گردید(9 -90-90)روز؛دمای آزمایشگاه نیزنسبت به دو دمای دیگر، حالت بینابینی را دارا بود(53-59-66)روز.

سنجش PH اولیه نوشیدنی، اسیدی بودن آنرامشخص ساخت(0/1±4 3/8) و بررسی فاکتور مربوطه در مدت زمان ماندگاری نوشیدنیهای پروبیوتیک شده به ترتیب در سه رقت متفاوت (102-104-106cfu/ml)ودر سه دمای متفاوت(آزمایشگاه، یخچال، انکوباتور)تغییرات PHرا این چنین ثبت نمود(2.81-2.79-2.77)-(2.87-2.84-2.82)-(3.33-3.31-3.29) و ضمن رشد باکتری عدم تغییرات محسوس در PHکه دلالت بر عدم تغییرات درکیفیت نوشیدنی را دارا میباشد، به اثبات رساند.

نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌کند مصرف نوشیدنی پروبیوتیک شده به عنوان یک نوشیدنی سالم ازطریق تثبیت فلور میکروبی طبیعی روده، تعادل اعمال متابولیک،تقویت سیستم ایمنی،... در رژیم غذایی افراد مختلف به صورت عامل پشتیبان و راهکاری درمانی، مناسب و مؤثر بویژه برای گیاهخواران، افراد مبتلا به آلرژی نسبت به تولیدات لبنی، افراد مبتلا به بیماریهای گوارشی و غیرگوارشی ارزشمند و مطلوب محسوب می‌گردد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک،لاکتوباسیلوس فرمنتوم(Lactobacillus Fermentum)،نوشیدنی میوه ای برپایه لبنی،PH

Probiotication of dairy-based fruit Juice with *Lactobacillus fermentum* under fermentative and non-fermentative contestations

[,*]- M.R.Fazeli ,[*]Samieh pouragahi**

a.Ph.D student of Molecular Medicine,M.Sc of Microbiology,Faculty of Medical Sciences of Qazvin

b. Associate Professor of Department of Food &Drug, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences.

Probiotic Research Laboratories ,Department of Drug and Food Control and Pharmaceutical Quality Research Center, Faculty of Pharmacy,Medical Sciences,University of Tehran, Iran

Probiotices are defined as "live microorganisms"or"live microbial feed supplement" that benefically affect the host by improving intestinal flora balance and probiotication is one of the methods used to produce fermented functional foods. Probiotics have traditionally been consumed as constituente of fermented dairy product such as yogurt but have also been incorporated into drinks like yogurt and dairy-based fruit juice.

Probiotics are increasingly being marketed as dietary supplements in tablet, capsule, and freeze-dried preparation.

There is curently a worldwide trend in development of probioticated fruit Juices with the benefical selected strains of lactobacilli. This study undertaken to determinate the suitability of dairy-based fruit Juice as a row material for production of probiotic beverage by lactic acid bacteria under fermentative and non fermentative conditions.

Flasks each containing 100 ml. of a commercial dairy- based fruit Juice(Pegah)were inocubated with fresh 48 h. culture of *Lactobacilli(*10^2 cfu/ml) to reach 10^8 cfu/ml.

The viable cell counts (CFU/ml) were determined by standard plate method with *Lactobacilli* MRS medium in the probioticated Juice were also investigated at Incubator, Room temperature, and 4°C for a period of 3 month.

Changes in PH were measured during under fermentation and non fermentation conditions.

The objective of this study was to investigated viablility cell counts of *lactobacillus* remained in high cell density(10^8 cfu/ml)of fermentation probioticated dairy-based fruit juice were increase than to non-fermentative probioticated fruit juice even with low cell density(10^2 cfu/ml)

The viability of *lactobacillus* species were maintained at cell density(10^8cfu/ml) in the commercial fruit Juice for 3month at4°C while those at Room temperature and 37°C incubator were kept the cell density only for few days under non-fermentative condition between different cell density *L.Fermentum*(10^2-10^4-10^6 cfu/ml) (53-59-66)at room temperature and (41-47-57)at 37°C incubator.

The lactic acid cultures reduced the PH of(3.84±0.1)to(2.38&3.39)under fermentative condition at Room temperature and 4°C,Respectly;and showed a decrease of PH to (2.81-2.79-2.77),(2.87-2.84-2.82),(3.33-3.31-3.29) under non-fermentative condition at incubator,room temperature and 4°C for different cell viability(10^2-10^4-10^6 cfu/ml) Respectly;Therefore no significant difference PH was observed between cell densities of *lactobacillus* under fermentative and non-fermentative condition with initial PH value (3.84±0.1).

Recent clinical trials have demonstrated the beneficial health effects of probiotic bacteria that have been incorporated in foods and animal feed.These effects include the prevention of diarrhea,balancing of intestinal microflora,stimulation of the immune system,modulation of systemic immune homeostasis, antitumor properties, and lactose intolerance;In addition to Probiotication of dairy-based fruit Juice are possible providing a cold chain storage condition and drinks-probioticated with selected *Lactobacilli* strain could have beneficial role in combating food-born disease due to contaminated pathogenic bacteria.

The result of this search suggest that fermented dairy-based fruit Juice might serve as a probiotic beverage for vegetarians and consumers who are allergic to dairy product.

Key words:Probiotics,Dairy-based fruit juice,Lactic acid bacteria,*Lactobacillus fermentum,* Ph=H

شناسه: PH24

بررسی خواص پروبیوتیک باکتریهای اسید لاکتیک جدا شده از

میکروتای روده در ماهی

لاله یزدانپناه گوهرریزی[1] ، سیمین یزدانپناه[2]

عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان و عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد کرمان

عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد کرمان

هدف از این مطالعه ارزیابی قابلیت و توانایی 3 باکتری اسید لاکتیک (LAB) جدا شده از ماهی (لاکتوکوکوس لاکتیس ، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس فرمنتوس) در ممانعت از چسبندگی چندین پاتوژن ماهی (آیروموناس هیدروفیلا ، آیروموناس سالمونیسیدا ، یرسینا روکری و ویبریو آنگویلاروم) به انگلهای موکوس روده ای تحت شرایط In vitro بود. نتایج نشان داد که فقط لاکتوکوکوس لاکتیس در تمامی پاتوژنهای ماهی تولید چسبندگی می کند . در حالیکه لاکتوباسیلوس پلانتاروم چسبندگی آیروموناس هیدروفیلا و سالمونیسیدا را کاهش میدهد . به غیر از ویبریو آنگویلاروم چسبندگی تمام پاتوژنهای ماهی توسط باکتری l.Fermentum و

از طریق میکس 3 سویه LAB به شدت کاهش می یابد. به علاوه فقط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس زمانیکه در محیط مایع شمارش گردید فعالیت های آنتی باکتریال بر علیه تمام پاتوژنهای ماهی را نشان داد. همه سویه های باکتری اسید لاکتیک (LAB) قادر بودند در pH پایین و غلظت بالای صفرای ماهی زنده بمانند .

کلید واژه ها : پروبیوتیک – باکتریهای اسید لاکتیک – میکروبیوتای روده – ماهی

Study of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish

Laleh yazdanpanah goharrizi , S.yazdanpanah

Agriculture &natural resource research center

The aim of this study was to evaluate the ability of three lactic acid bacteria (LAB) isolated from fish,

Lactococcus lactis, Lactobacillus plantarum, and Lactobacillus fermentum to inhibit adhesion of several fish pathogens (Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicida, Yersinia ruckeri and Vibrio anguillarum) to host intestinal mucus under in vitro conditions. The results showed that only Lc. Lactis reduced the adhesion of all fish pathogens, whereas L.plantarum reduced the adhesion of A. hydrophila and A. salmonicida. With the exception of V.anguillarum, the adhesion of all fish pathogens to intestinal mucus was reduced by L. fermentum and by mixture of the three LAB strains. In addition, only Lc. lactis showed antibacterial activities against all fish pathogens as measured in spent culture liquid. All LAB strains were able to survive relatively low pH and high fish bile concentrations.

Key word **:** Probiotic- lactic acid bacteria **–** intestinal microbiota- fish

شناسه: PH25

بررسی اثر مکمل پروبیوتیک بر عملکرد رشد، ترکیب شیمیایی لاشه و درصد تلفات جوجه های گوشتی

صادق کریم زاده

عضو هیئت علمی گروه علوم دامی مؤسسه آموزش عالی رودکی تنکابن

Sadegh150@yahoo.com

این آزمایش به منظور بررسی اثر مکمل پروبیوتیک*(پریمالاک)* بر مصرف خوراک، افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، ترکیب شیمیایی لاشه و درصد تلفات جوجه های گوشتی انجام شد. تعداد 240 قطعه جوجه گوشتی جنس نر سویه "راس 308 " در قالب طرح کامل تصادفی با 2 تیمار و 4 تکرار به پن های اختصاص یافتند . جوجه های گوشتی با دو سطح تیمار مکمل پروبیوتیک (0 و 1 درصد) به مدت 1 تا 49 روز تغذیه شدند.وزن جوجه ها در شروع آزمایش یکسان بود.

نتایج این آزمایش نشان می دهد که افزایش وزن بدن و ضریب تبدیل غذایی جوجه های تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک به طور معنی داری بهبود یافته بود (P<0/05).افزودن مکمل پروبیوتیک به جیره غذایی تأثیر بر مصرف خوراک نداشت.همچنین ترکیب شیمیایی لاشه و درصد تلفات در جوجه های تغذیه شده با مکمل پروبیوتیک مشابه با تیمار شاهد(0 درصد مکمل پروبیوتیک)بود.

واژه های کلیدی :جوجه های گوشتی، عملکرد رشد ، مکمل پروبیوتیک ، ضریب تبدیل غذایی، درصد تلفات.

The effect of probiotic Supplement on growth Performance , carcass chemical composition and Mortality Percentage in broiler Chickens

Karimzadeh Sadegh

Department of Animal sciences, Roudaki higher education Institute, Tonekabon, Iran.

Sadegh150@yahoo.com

This experiment was conducted to evaluate the effect of probiotic supplement (*Primalac*) on feed intake, body weight gain, feed conversion ratio,carcass chemical composition and mortality percentage of broiler chicks. The number of 240 male broiler chicks of "Ross 308" strain selected and done in a randomized complete design was divided between pens at replication four . Broiler chickens fed by two levels of probiotic Supplement (0 , 0/1%) from 1 to 49 d of age. Weight of any broiler in start of trial was same. The results of this study indicated that body weight gain and feed conversion ratio in broilers fed with probiotic supplement significantly improved (p<0/05). The addition of probiotic supplement in the diet without affecting the feed intake. Also, carcass chemical composition and mortality percentage in broiler chicks that fed with probiotic Supplement was similar to control treatment (probiotic Supplement 0%).

Keywords**:** broiler chickens, growth Performance, probiotic supplement, feed conversion ratio, mortality percentage.

شناسه : PH26

بررسی تاثیر پروبیوتیک جیره غذایی به عنوان محرک رشد بر عملکرد و درصد تلفات بچه ماهی سفید دریای خزر

صادق کریم زاده[1] قاسم کریم زاده[2] حامد مفتاح[3] و کیا امانی[4]

عضو هیئت علمی گروه علوم دامی مؤسسه آموزش عالی رودکی تنکابن 1Sadegh150@yahoo.com.

2. رئیس اداره صید اداره کل شیلات مازندران

3.مدرس گروه شیلات و بیولوژی دریا دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

4.عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

در این مطالعه تاثیر پروبیوتیک *(پریمالاک)* جیره غذایی به عنوان محرک رشد بر مصرف خوراک، افزایش وزن ، ضریب تبدیل غذایی، ترکیب شیمیایی لاشه ماهی (رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر) و درصد تلفات در بچه ماهیان انگشت قد سفید دریای خزر انجام شد. جیره پایه ای شامل 37.5 درصد پروتئین خام ، 10.7 درصد چربی خام و انرژی متابولیسمی برابر 3000 کیلوکالری در کیلوگرم بوده است. دو سطح پروبیوتیک (0/09 و 0/1 درصد) به جیره پایه اضافه شد .این آزمایش شامل3 تکرار و بچه ماهیان در وان هایی با حجم 500 لیتر به مدت 8 هفته و روزانه 2 بار با جیره ها ی آزمایشی تغذیه شدند. افزایش وزن بدن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی ، نسبت بازده پروتئین در ماهیانی که با جیره حاوی پروبیوتیک تغذیه شده بودند در مقایسه با گروه شاهد معنی داری بود (P<0/05). ترکیب جیره های آزمایشی بر ترکیب شیمیایی لاشه و درصد تلفات ماهی تأثیر معنی دار نداشت.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، بچه ماهی سفید دریای خزر، محرک رشد، ضریب تبدیل غذایی و درصد تلفات.

The Study of Effect of dietary probiotic as growth stimulant on Performance and Mortality Percentage in Fry Caspian Kutum (Rutilus frisii kutum)

S. Karimzadeh [1], G. Karimzadeh [2], H. Meftah [3], K. Amani [4]

1. Department of Animal sciences, Roudaki higher education Institute, Tonekabon, Iran.

2. Administer of fishing office, Mazandaran Province Fisheries Administration, Iran.

3. Department of Marin Biology and Fishery, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Iran.

4.Young research club, Islamic Azad University, Ghaemshahr Branch, Iran.

Preliminary experiments were carried out to evaluate the effect of dietary probiotic (*Primalac*) as growth stimulant on feed intake, body weight gain, feed conversion ratio, carcass chemical composition and mortality percentage of fingerlings of Caspian Kutum. The basal diet contained 37.5% crude protein, 10.7% crude fat and metabolic energy levels of 3000 kcal/kg. Two levels (0.09 , 0.1 %) of Primalac were added to the basal diet. Each diet was fed to three replicate groups of fish in 500-L tanks twice daily at rates approximately satiation for 8 weeks. Significantly higher mean final weight, specific growth rate, feed efficiency, protein efficiency was observed in fish fed the diets supplemented with probiotic compared to the basal diet(p<0/05). after 8 weeks of feeding while carcass chemical composition and mortality percentage were not affected by various dietary treatments.

Key words**:** probiotic, fry Caspian kutum, growth stimulant, feed conversion ratio, mortality percentage.

شناسه: PH27

نقش باکتریهای پروبیوتیک در ماهی قزل آلای رنگین کمان و جلوگیری از لاکتوکوکوزیز

یزدانپناه گوهرریزی، لاله*

عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بخش تحقیقات شیلات و آبزیان

در این مقاله اثرات هم آوری پروبیوتیک ها روی کنترل لاکتوکوکوزیز در ماهی قزل آلای رنگین کمان مورد ارزیابی قرار گرفته است . سویه های پروبیوتیک leuconostoc mesenteroides و لاکتوباسیلوس پلانتاروم lactobacillus plantarum بین ماهیها به مدت 30 روز

در 10^7 $cfug^{-1}$ توزیع شد . روزهای سی ام پس از شروع تغذیه پروبیوتیک ها ماهیها با باکتری لاکتوکوکوس garvieae به رقابت برخاستند . ارزیابی پروبیوتیک ها نشان دهنده کاهش مرگ و میر ماهیها بطور معنی داری از 78٪ در گروه کنترلی به 46–54٪ گردید. لاکتوکوکوس گارونیه یک کوکوس گرم مثبت پاتوژن می باشد که باعث ضررهای اقتصادی فراوان در موجودات دریایی و گونه های ماهی آب شیرین می گردد. خصوصا در طی ماههای تابستان که با بالارفتن دمای آب مرتبط می باشد . همچنین چندین مورد از این میکروارگانیزم از انسانها نیز جدا شده است .

واژه های کلیدی : پروبیوتیک – ماهی قزل آلای رنگین کمان – لاکتوکوکوزیز

Protection of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) from lactococcosis by probiotic bacteria

Yazdanpanah goharrizi.laleh

Agriculture &natural resource research center in kerman

We analysed the effect of probiotic supplementation on the control of lactococcosis in rainbow trout. Probiotic strains Leuconostoc mesenteroides CLFP 196 and Lactobacillus plantarum CLFP 238 were administered orally to fish for 30 days at 107CFUg_1 feed. Thirty days after the start of the probiotic feeding, fish were challenged with Lactococcus garvieae. Probiotic supplementation reduced fish mortality significantly, from 78% in the control group to 46–54% in the probiotic groups.

Keywords: Probiotics - Rainbow trout - Lactococcosis

شناسه: PH28

بررسی اثرات استفاده از پروبیوتیک ها در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد و بقای لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

جعفری خورشیدی، کاوه [*، **] [1] .، امامقی، امیرارسلان [2] و عسکریان، فاطمه [3]

[1] استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر، kaveh.khorshidi@gmail.com

[2] کارشناس ارشد علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

[3] استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه

در این آزمایش اثر مقادیر مختلف پروبیوتیک‌های Yeasture (شامل0/1، 0/2 و 0/3 کیلوگرم در تن)، بلوگاتکسI (شامل 10×2 ،^{9} CFU/gfood 10×5 و 9×10^{9}) و بلوگاتکس II (شامل ^{9} CFU/gfood 10×2، ^{9} 10×5 و 9×10^{9}) و مخلوطی از مقدار متوسط هر یک از آنها و جیره شاهد (فاقد پروبیوتیک)، در قالب 11 تیمار آزمایشی به مدت 60 روز تغذیه شدند و اثرات آنها بر میزان رشد و بازماندگی 3300 لارو ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (با میانگین وزنی 0/005 ± 0/37 گرم و طول کل 0/278 ± 3/1 سانتی‌متر) مورد بررسی قرار گرفت. در طی دوره آزمایش، عملیات زیست‌سنجی هر 7 روز یکبار انجام شد و شاخص‌های رشد مشتمل بر طول کل، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه، ضریب چاقی و درصد بقاء براساس استاندارد تعیین گردید. نتایج حاصل از این نشان داد که بالاترین میزان شاخص‌های رشد شامل وزن، ضریب رشد ویژه و ضریب چاقی و بهترین ضریب تبدیل غذایی، در تیمار تغذیه شده با بیشترین مقدار بلوگاتکس II بوده و دارای تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها بوده است (P<0/05). تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک از میزان وزن و ضریب رشد ویژه بالا و ضریب تبدیل غذایی کمتری نسبت به تیمار شاهد برخوردار بودند. بررسی‌های آماری حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار (P<0/05) در طول کل، درصد بقاء و شاخص وضعیت (CF) بین تیمارها می‌باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، بلوگاتکس I, II ، Yeasture، لارو، قزل‌آلای رنگین کمان

The effects of the application of the Yeasture and Belugatex I,II as probiotics on growth parameters and Survival Index of rainbow trout larvae

In this experiment the effect of probiotic supplementation in diet of rainbow trout larvae was evaluated using Yeasure (0.1, 0.2 and 0.3 kg/metric tonn of diet), BelugatexI (2, 5 and 9 $\times 10^{9}$ CFU I/g food), BelugatexII (2, 5 and 9 $\times 10^{9}$ CFU I/g food) and a Mixture of these probiotics and a control group (with no supplemental probiotic). Eleven treatments in a sixty days experimental period was performed on 3300 rainbow trout larvae (*oncorhynchus mykiss*) in three replication. Bioassyas were performed each 7 days interval along the experiment. Growth indices was measured, including body length, feed conversion ratio (FCR), specific growth rate (SGR), condition factor (CF) and survaivability. The results of the experiment indicated that highest growth indices (Body weight, SGR and CF) and best FCR belong to groups fed standard diet supplemented with blugatexII probiotic (9×10^{9} CFU BELUGATEX I/g food). And there was a significant statistical difference between treatments (P<0.05). all probiotic treatments cause better results in body weight gain, SGR, CF and FCR compared with control group.

Key words: probiotic, belugatex I ،II ،yeasture, larvae, Rainbow trout.

شناسه: PH29

تأثیر آب پنیربرافزایش کیفی وکمی تخم مرغ مرغان بومی در فصل زمستان

صفائی فیروزآبادی محمد صادق 1.3، صفائی فیروزآبادی مهدی2، زارع زاده مهریزی محمد مهدی1***

1- دانشجوی دکتری دامپزشکی دانشگاه آزاد شهرکرد2- دانشجوی پزشکی دانشگاه بقیة اللهتهران 3- عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد شهرکردSafaee_sadegh@yahoo.com

با سرد شدن هوا در فصل زمستان وبا توجه به محدودیت های دمایی، تولید تخم مرغ در مناطق روستایی و سایر مرغداری هایی که در تأمین دمای مطلوب با مشکل مواجه هستند؛ از نظر کیفی وکمی کاهش می یابد. از این رو می توان با اضافه کردن یک منبع طبیعی و ارزشمندپروبیوتیکی مانند آب پنیر به جیره غذایی مرغان بومی ضمن کاهش هزینه های نگهداری، بر استرس سرمایی غلبه کرد. در این تحقیق از 90 قطعه مرغ بومی تخمگذار در سن 38 هفتگی طی مدت 30 روز استفاده شد. طرح کاملاً تصادفی با 3 تیمار و 3 تکرار(9 قفس10 تایی) انجام شد. تیمارهای آزمایشی به ترتیب عبارت بودند از: 1- گروه اول (شاهد) که در کل دوره جیره پایه (بر اساس ذرت و سویا) دریافت کردند ودر دمای12-8 درجه سانتیگراد نگهداری شدند؛2-گروه دوم در کل دوره جیره پایه دریافت کردند ودر دمای20-16 درجه سانتیگراد نگهداری شدند ؛ 3-گروه سوم در کل دوره جیره پایه به همراه محلول آب پنیر5٪ دریافت کردند و در دمایی مشابه گروه شاهد نگهداری شدند. در ادامه بعد از گذشت 10 روز از اجرای تیمار های مربوطه، تعداد تخم مرغ ها و بعضی از شاخص های کیفی آن در هر گروه اندازه گیری و آنالیز گردید. :با توجه به اینکه آب پنیر با ارزش غذایی وپروبیوتیکی بالا به مقدار زیاد در مناطق روستایی به عنوان یک محصول فرعی تولید و در اغلب موارد دور ریخته می شود.مهم ترین اولویت این تحقیق، تعیین میزان اثر بخشی آب پنیر بر تخم گذاری مرغان بومی در فصل زمستان واسترس های سرمایی می باشد.نتایج تحقیق حاکی از آن است که میزان تخم گذاری در گروه های دوم و سوم به ترتیب 60 ٪ و 50٪ افزایش یافت. اما نکته قابل توجه این بود که تخم مرغ های گروه سوم از لحاظ شاخص هایی چون ضخامت پوسته، میانگین وزنی و کلسترول کمتر زرده، نسبت به سایر گروه ها افزایش یافته بود و با اینکه از نظر خوراک مصرفی نسبت به گروه دوم در یک سطح قرار داشتند ولی از نظر کیفیت رابطه معنی داری را ایجاد کرده بود (P< 0/05). این یافته ها با نتایج محققین دیگری چون کورتگلو و همکاران (2004) مطابقت داشت؛ این موضوع از خواص پروبیوتیکی آب پنیر ناشی می شود که با استفاده از لاکتوباسیلوس ها می تواند ضمن ایجاد یک فلور میکروبی مفید در دستگاه گوارش پرنده به تحریک سیستم ایمنی، تسهیل هضم، سنتز و جذب برخی از مواد معدنی و ویتامین ها کمک کند. پس می توان با اضافه کردن آب پنیر به جیره غذایی مرغان تخم گذار، مقداری از خسارت های ناشی از استرس سرمایی در کاهش تولید تخم مرغ را جبران نمود.

کلمات کلیدی: آب پنیر، تخم مرغ، پروبیوتیکی، استرس سرمایی

Effect of Whey in Increasing of Domestic Fowls' Egg in Winter

Safaee Firouzabadi. M. S1. 3, Safaee Firouzabadi. M2, Zarezadeh Mehrizi. M. M1***

1-Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University of Shahr-e- kord, Iran Safaee_sadegh@yahoo.com

2-Baqiyatallah university of Medical science of Tehran, Tehran, Iran

3-Young Researchers Club of Islamic Azad University of Shahr-e- Kord, Iran.

Introduction**:** When the weather is getting cold in winter and according to temperature limitation, egg production decreases in rural areas and other avicultures that suffer from keeping optimal temperature quantitatively and qualitatively, therefore; we can decrease cost of sustenance and conquest on cold stress with adding a natural valuable source, a probiotic substance, like whey to egg mash.

Materials & Methods**:** In this study 90 domestic fowls in 38 weeks old and duration of 30 days were used. The study was completely random and with 3 cares and 3 repetitions (9 cages with 10cases in each of them) were done. The testable cares were in order: (1)the first group(witness) that received basal egg mash in total period (based on corn and soya) and was kept in 8-12^{c}, (2)the second group received basal egg mash in total period and was kept in 16-20^{c}, (3) the third group received basal egg mash with 5% solution of whey and was kept in a same temperature like witness group, then after 10 days from care performance, number of eggs and some of their qualitative indexes in each group were analyzed and measured.

Objectives**:** According to this point that whey has a high dietary and probiotic value and in high volume is being produced in rural areas as an accessory product and often is being thrown away. The first priority in this study is determination of effectiveness about whey in egg laying of domestic fowls in winter and cold stress.

شناسه: PH30

تاثیرضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداسازی شده ازروده ماهی برروی برخی پاتوژن های روده ای

فئید، منیره (MSC)، خطیب حقیقی ، سپیده (Bc) ، دقیق روحی، جواد(MSCm_faeed@yahoo.com)**

پروبیوتیکها از میکروارگانیسمهای زنده ای که همانند میکروارگانیسمهای مفید پیدا شده در دستگاه گوارش انسان می باشد .آنها همچنین باکتریهای موافق یا باکتریهای خوب (مفید) نامیده می شوند پروبیوتیکها بطور عمده ای بصورت مکملهای رژیمی وغذایی در دسترس مصرف کنندگان قرار می گیرند لاکتوباسیلوس ازباکتریهای روده کوچک است باعث افزایش عملکرد روده در جذب مواد غذایی ومانع از رشد باکتریهای فرصت طلب وکلونیزه شدن آنها می گردد در این تحقیق لاکتوباسیوس پلانتاروم ، جداسازی شده از روده بچه ماهیان در محیط MRS آگار کشت داده سپس سایر باکتریهای پاتوژن جداسازی شده از روده ماهی بر روی محیط مولرهینتون آگار کشت داده شد و لاکتوباسیل را با غلظت 50 و 100 میکرولیتر را بر باکتریها در چاهک تعبیه شده اثر داده وبعد از 24 ساعت نتایج مورد بررسی قرار گرفت . لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی سودوموناس ، سالمونلا ،ویبریو و اشرشیاکلی تاثیر داشته است .

برخی از پروبیوتیکها برروی میکروارگانیسمها تاثیر بازدارنده دارند نتایج بیانگر آن است که از این پروبیوتیک جهت تصفیه وسالم سازی محیط های آبی می توان بهره برد .

کلمات کلیدی : لاکتوباسیلوس پلانتاروم ، پروبیوتیک

Effect antimicrobal of lactobacillu plantarum on the some intestinal pathogen

Faeed ، monireh (MSC) **khatib haghighi ، sepideh(Bc) ، Daghigh rohi،javad(MSC)

Researcher in biology, Iland water Aquaculture Research Institute , Anzali , Iran.

Probiotics are live microorganisms (in most cases, bacteria) that are similar to beneficial microorganisms found in the human gut. They are also called "friendly bacteria" or "good bacteria." Probiotics are available to consumers mainly in the form of dietary supplements and foods. Lactobacillus is a main bacteria in retinal that caused in creasing function in intesting in absorbing food stuff and it prevent of opportunist bacteria growth and their colonization in this research there is four kinds different lactobacillus .

Lactobacillus plantarum isolated from fish intestinal cultured in MRS agar .then pathogen bacteria isolated from fish intestinal cultured on the MHA and effect different lactobacillus with 50, 100 µl density on bacteria and results surveyed after 24 hours . L.plantarum effect on the pseudomonas, salmonella, vibrio and Ecoli, the result shows that probiotic can be used for purification, safe water in vironmental.

Key word: lactobacillus plantarum, probiotic

شناسه:PH31

تعیین قابلیت هضم آزمایشگاهی (*In-vitro*) تفاله لیمو ترش عمل آوری شده

با مخمر ساکارومایسز سرویسیا

پوریا دادور[1]، امید دیانی[2] ، ملیحه مروت[1] و محمد آذر زمزم[3]

1- عضو انجمن پژوهشگران جوان و دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام دانشگاه شهید باهنر کرمانpooryadadvar@yahoo.com

2- استادیار بخش مهندسی علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان

3- کارشناس بخش علوم دام مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان

یکی از راه کار های جبران کمبود مواد مغذی در خوراک دام استفاده از پروبیوتیک ها جهت فرآوری خوراک می باشد. از آنجایی که ضایعات مرکبات از ارزش پروتئینی پایینی برخوردار هستند لذا می توان با فرآوری آن ها توسط مخمر ها و قارچ ها به نحو بهتری از آنها در تغذیه دام استفاده نمود. در این آزمایش از ضایعات میوه لیمو ترش حاصل از کارخانه آبلیمو گیری استفاده گردید و از مخمر ساکارومایسز سرویسیا به منظور عمل آوری و افزایش غلظت مواد مغذی آنها استفاده شد. نتایج نشان داد که عمل آوری تفاله لیمو با مخمر باعث افزایش معنی داری در محتوای پروتئین خام ($P<0/01$) و دیواره سلولی بدون همی سلولز ($P<0/05$) تفاله لیمو گردید ولی درصد دیواره سلولی ($P<0/01$) و ماده آلی ($P<0/05$) آن کاهش یافت. نتایج حاصل از تجزیه پذیری آزمایشگاهی نشان داد که در طی عمل آوری قابلیت هضم ماده آلی قابل هضم در ماده خشک به طور معنی داری ($P< 0/05$) کاهش یافت در حالی که قابلیت هضم ماده خشک و همچنین قابلیت هضم ماده آلی تغییر معنی داری نداشت . علاوه بر این انرژی قابل متابولیسم نیز به طور معنی داری ($P<0/05$) کاهش یافت. می توان نتیجه گرفت که عمل آوری تفاله لیمو با مخمر ساکارومایسزسرویسیا باعث افزایش بهره وری این محصول می شود.

کلمات کلیدی: تفاله لیمو ترش، پروبیوتیک، مخمر ساکارومایسز سرویسیا، تجزیه پذیری، انرژی قابل متابولیسم

Determination of processed lime pulp digestibility with

Saccharomyces cerevisiae yeast by in-vitro method

P. Dadvar, O, Dayani, M, Morovat, M, Azar Zamzam

One of the strategies for compensating nutrients deficiency in animal foods is usage of probiotics for feed processing. Whereas citrus fruits wastages have low protein value, so we can use them in a better manner in animal feeding by processing them with yeasts and funguses. In this experiment lime wastages from lime-juice factory and Saccharomyces cerevisiae yeast for processing and increasing their nutrients concentration were used. The results have been showed that processing lime pulp with yeast caused a significant increase in lime pulp crude protein content ($p<0.01$) and ADF ($p<0.05$) but its cell wall percent ($p<0.01$) organic matter ($p<0.05$) was decreased. Results of in vitro degradability showed that with processing, **(**digestibility of digestible organic matter in dry matter was decreased significantly**)** ($p<0.05$) whereas dry

matter digestibility and also organic matter digestibility didn’t have any significant change. In addition metabolisable energy also was decreased significantly ($p<0.05$). So we can conclude that processing lime pulp with Saccharomyces cerevisiae causes an increase in fruition of this product.

Key words: lime pulp, probiotic, Saccharomyces cerevisiae, degradability, metabolizable energy

شناسه: PH32

کنترل کوکسیدیوز و کوکسیدیاهای مختلف جوجه در تکنولوژی های انتخابی

در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری

پوریا دادور1، امید دیانی2 ، مسلم شجاعی3 و ملیحه مروت1

1- عضو انجمن پژوهشگران جوان و دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام دانشگاه شهید باهنر کرمان

2- استادیار بخش مهندسی علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمانpooryadadvar@yahoo.com

3- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه شهید باهنر کرمان

کوکسیدیاها انگل های پروتوزوایی رایجی هستند. در گذشته بیشتر تولیدکنندگان جوجه های گوشتی کوکسیدیوز را با استفاده از داروهای ضد کوکسیدیال در خوراک طیور، کنترل می کردند، اما این روش با توجه به روند در حال رشد پرنده، نسبت به سلامت خوراک کمتر مطلوب است. امروزه واکسیناسیون با آلوده کردن طیور جوان با یک دوز مشخصی از انگل های کوکسیدیایی زنده انجام می شود. این واکسیناسیون طیور را در برابر بیماری ایمن خواهد کرد. پروبیوتیک (Enterococcus Faeciu) یک جز رایج از میکروب های روده ای انسان ها یا حیوانات است. در این مطالعه با مقایسه اثر افزودن مکمل خوراکی پروبیوتیک
(Enterococcus Faeciu) در جیره شامل اثر داروی ضدکوکسیدیوز بر عملکرد جوجه گوشتی، جیره بدون داروی ضدکوکسیدیوز یا واکسن بر عملکرد جوجه گوشتی، جیره حاوی واکسن کوکسیدیایی عملکرد جوجه گوشتی بررسی شده است.

کلمات کلیدی: جوجه گوشتی، ضدکوکسیدیوز، واکسن، پروبیوتیک، باکتری ها

Control of coccidiosos and different coccidian of chicken

In selected technologies used in tropics and subtropics

P. Dadvar, O. Dayani, M. Shojaie and M. Morovat

Coccidia are common protozoan parasites. In the past, most broiler producers have controlled coccidiosis by providing anticoccidial drugs in poultry feed, this approach is becoming less desirable in light of growing public concern about food safety. Presently, vaccination consist of infecting young poultry with a known dose of live coccidian parasites. This vaccination will immunize poultry against the disease, The probiotic (Enterococcus faecium) is a common component of intestinal microbial of normal human and animals. The objectives of this study are: to compare the effect of additive and nonadditive of probiotic feed supplement (Enteroccus faecium) in the: diet contains anticoccidia on performance of

broiler, diet without anticoccidia or vaccine (control) on performance of broiler, diet contains coccidia vaccine on performance of broiler.

Key words: broiler, anticoccidial, vaccine, probiotic, bacteria.

شناسه:PH33

بررسی امکان افزایش تعداد باکتری های پروبیوتیکی بومی روده بچه فیل ماهی (*Huso huso*) با استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* Var. *ellipsoideus* در جیره

سید حسین حسینی فر[1*]، مرتضی یوسفی[2]**

1*** عضو باشگاه پژوهشگران جوان، واحد ورامین پیشواHoseinifar@ut.ac.ir

2 گروه شیلات، دانشگاه تربیت مدرس

هدف از این مطالعه تعیین اثرات افزودن سلول های غیرفعال مخمر ساکارومایسس سروزیه واریته الیپدوس (*Saccharomyces cerevisiae* Var. *ellipsoideus*) به جیره بر باکتری های پروبیوتیکی موجود در میکروفلور بومی روده بچه فیل ماهی (*Huso huso*) بود. سلول های غیرفعال مخمر مذکور در سطوح 1، 2 و 5 درصد به جیره غذایی بچه فیل ماهی اضافه شده و بچه ماهی ها به مدت 7 هفته با جیره های آزمایشی تغذیه شدند. در انتهای دوره سطوح باکتری های پروبیوتیکی (جنس لاکتوباسیلوس) و تعداد کل باکتری ها در میکروفلور روده به ترتیب از طریق کشت بر روی محیط های کشت های MRS آگار و پلیت کانت آگار (PCA) تعیین شدند. بررسی آماری نتایج نشان داد که میزان باکتری های جنس لاکتوباسیلوس با افزایش سطح مخمر جیره افزایش می یابد بطوریکه در تیمار 5٪ بیشترین افزایش را داشت. با این وجود تفاوت معنی داری بین تعداد لاکتوباسیلوس ها در تیمار 1 و 2 ٪ با شاهد وجود نداشت. افزایش تعداد لاکتوباسیلوس ها در تیمارهای تغذیه شده با سلول های غیر فعال مخمر به دلیل تامین نیازهای غذایی این باکتری های برای رشد و افزایش تعداد می باشد. با توجه به اثرات سودمند باکتریهای پروبیوتیکی، استفاده از مخمر ساکارومایسس سروزیه واریته الیپدوس، راهکاری مناسب جهت افزایش تعداد و غالبیت آن ها در فلور باکتریایی روده بچه فیل ماهی می باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، مخمر، روده، فیل ماهی

The study of possible increase of probiotic bacteria in intestinal microbiota of beluga juveniles (*Huso huso*) using dietary yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Var. *ellipsoides*)

Seyed Hossein Hoseinifar*[1], Morteza Yusofi[2],**

1*** member of Young Researchers center, Varamin-Pishva branch . hoseinifar@ut.ac.ir

2 Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tarbiat Modares

The aim of this study was determination of dietary inactive yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Var. *ellipsoideus*) cells on indigenous probiotic bacteria of beluga juveniles (Huso huso) intestinal microbiota. Diet was supplemented with different

levels 1, 2 and 5% Inactive yeast cell and juveniles fed with experimental diet for 7 weeks. At the end of trial, Lactic Acid Bacteria (LAB) and total bacteria in intestinal microflora of beluga juveniles were determined by culturing on Plate Count Agar (PCA) and MRS Agar media, respectively. Statistical analysis of results showed that LAB levels increased with increasing dietary inactive yeast cells levels and the highest level was in 5% treatment. However, there were no significant differences between 1 and 2% yeast and control treatment. Elevation of LAB in intestinal microflora of beluga juveniles fed dietary inactive yeast cells is due to supply nutritional needs of the probiotic bacteria. As probiotic bacteria are very beneficial, using yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Var*. ellipsoideus*) is a good approach for increasing their number and dominance in intestinal microbiota of beluga juveniles.

Keyords: probiotic, Lactobacillus, yeast, intestine, beluga

شناسه : PH34

اثر تغذیه پروبیتیک درگله های مرغ مادر و تخمگذار بر تولید و کیفیت تخم مرغ

موحده لطفی*، علی خطیبی بردسیری**

دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی_ تغذیه دانشگاه شهید باهنر کرمان m. lotfi@rocketmail.com *

تاثیر پروبیوتیک ها بر عملکردهای تولیدی و کیفیت تخم مرغ در گله های مرغ تخم گذار در سطوح مختلف مطاله شده است. نتایج حاصله نشان داده است که تغذیه پروبیوتیک موجب افزایش معنی داری در سرعت رشد مرغ های تخم گذار شده و وزن بدن نیمچه را در زمان بلوغ افزایش می دهد و همچنین موجب افزایش بازده غذا و بهبود ضریب تبدیل خوراک می شود. مصرف پروبیوتیک در تغذیه مرغ های تخم گذار باعث افزایش کیفیت پوسته تخم مرغ شده، رنگ و کیفیت زرده و همچنین واحد هاف(Haugh) بهبود می یابد، در عین حال میزان کلسترول زرده کاهش می یابد. استفاده از پروبیوتیک ها میزان تولید و وزن تخم مرغ را افزایش می دهد و تعداد تخم مرغ های صدمه دیده کاهش می یابد. در یک آزمایش استفاده از پروبیوتیک در خوراک مرغ های تخم گذار باعث افزایش درصد تخم گذاری گله شده است. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از 500 میلی گرم پروبیوتیک در یک کیلوگرم خوراک باعث افزایش متوسط وزن تخم مرغ تولیدی کل گله تا 50/21 گرم می شود. یکی از اثرات مهم مصرف پروبیوتیک افزایش استحکام و ضخامت پوسته تخم مرغ می باشد. این مسئله زمانی اهمیت بیشتری می یابد که پرنده در اوج تولید خود قرار داشته باشد و کیفیت پوسته به دلیل تولید زیاد کاهش یابد.

پروبیوتیک ها بستری مناسب برای جذب کلسیم و فسفر در روده فراهم می کنند. ثابت شده است که این باکتری های پروبیوتیک ها با کاهش pH روده و افزایش کلسیم و فسفر حفاظت شده و قابل جذب، باعث جذب بیشتر این دو ماده معدنی می شوند لذا محتوای کلسیم، فسفر، کارتنوئیدها و آلبومین را در سرم خون افزایش می دهند و از دو طریق موجب کاهش کلسترول خون می شوند: 1) استفاده از کلسترول موجود در شیره پانکراس و شیره روده برای مصرف و متابولیسم خود و به دنبال آن میزان جذب کلسترول از غشای روده کاهش می یابد 2) مهار آنزیم هیدروکسی 1- متیل 1- گلوتاریل کوآنزیم A. مصرف پروبیوتیک ها میزان باروری و قابلیت هچ را افزایش می دهد و علاوه بر کاهش آلودگی تخم مرغ نطفه دار کیفیت نیز بهبود می یابد. این موضوع در مزارع پرورش مرغ مادر از لحاظ اقتصادی و بهداشتی بسیار حائز اهمیت می باشد. تغذیه پروبیوتیک ها در اواخر دوره تولید سبب افزایش در تولید و کیفیت تخم مرغ می شود. علاوه بر این تغذیه این میکروارگانیسم ها در زمان تولک بری باعث افزایش تولید و کارایی در دوره بعد تخم گذاری می شود. سرعت مرگ ومیر در مرغ های تغذیه شده با پروبیوتیک ها کاهش چشمگیری می یابد. این اثر به دلیل تاثیر مطلوبی است که این میکروارگانیسم بر روی ترکیب فلور میکروبی معده حیوان می گذارد و باعث از بین رفتن پاتوژن های موجود در دستگاه گوارش و افزایش توان ایمنی بدن می شود. سالمونلوسیس بیماری مشترک بین انسان و دام می باشد و از طریق محصولات آلوده طیور به این پاتوژن به انسان منتقل می شود علاوه بر این ابتلای طیور مخصوصا مرغ های تخم گذار و مرغ مادر به این بیماری صدمات جبران ناپذیری به واحدهای پرورش این

پرندگان وارد می نماید. تحقیقات و مطالعات متعدد نشان داده است که مصرف پروبیوتیک به میزان 500 میلی گرم در کیلوگرم خوراک بهترین اثر گذاری را دارا می باشد و مصرف بیش از این مقدار افزایش معنی داری را نشان نمی دهد.

کلمات کلیدی: پروبیتیک، گله مرغ های مادر و تخم گذار، تخم مرغ، کلسترول

شناسه :PH35

بررسی اثرات جیره های غذایی حاوی مخمر ساکارومایسیس سرویزیا (*Saccharomyces cervisia*) بر رشد، زنده مانی، کیفیت گوشت و مقاومت در برابر تنش های محیطی ماهی سوروم (*Heros severus*)

مهدی پورداود [1]، میر مسعود سجادی [2]، امیرهوشنگ بحری [3]، حمیدرضا احمدنیا [4]**

[1]- مرکز آموزش جهادکشاورزی استان فارسHamid.ahmadnia@gmail.com

[2]- گروه زیست شناسی دریا ، دانشکده علوم پایه دانشگاه هرمزگان صندوق پستی 3995 بندر عباس ایران

[3]- دانشگاه آزاد اسلامی واحد هرمزگان

[4]- گروه شیلات و محیط زیست، دانشگاه تهران **

یکی از پروبیوتیک هایی که به طور معمول در آبزی پروری مورد استفاده قرار می گیرد مخمر نانوایی یا ساکارومایسیس می باشد. این میکروارگانیزم ها منبع خوبی از پروتئین ها، نوکلئوتید ها، ویتامین ها پلی ساکاریدها و بتاگلوکان می باشند. مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثرات مخمر پروبیوتیکی ساکارومایسیس سرویزیا (*Saccharomyces cervisia*) روی رشد، بازماندگی و مقاومت در برابر استرس های محیطی ماهی سوروم (*Heros severus*) انجام شد. آزمایش فوق به صورت یک طرح کاملاً تصادفی در قالب 4 تیمار و 3 تکرار صورت پذیرفت. تیمارها شامل سه سطح $0/5\times10^{12}$ ،1×10^{12} و 2×10^{12} سلول مخمر در هر کیلوگرم جیره غذا بودند که طی 30 روز به مصرف ماهی رسیدند. نتایج نشان داد که مخمر مورد نظر بر مبنای میزان بکار رفته، بر شاخص های رشد (وزن نهایی، نرخ رشد ویژه) و نرخ بقاء، تاثیرات مثبت و معنی داری داشتند ($p<0/05$)، همچنین ضریب تبدیل غذایی (FCR) و ضریب کارایی پروتئین (PER)، به طور معنی داری کاهش یافت ($p<0/01$). در آزمایش تنش با آمونیاک نیز، کاربرد جیره های حاوی مخمر نسبت به گروه شاهد، سبب ارتقای نرخ بقاء بچه ماهیان تحت تیمار شد. در نتیجه کاربرد این مخمر پروبیوتیکی می تواند علاوه بر افزایش سطوح پروتئین لاشه با کاهش میزان غذای مورد نیاز آبزیان و همچنین بالا بردن مقاومت ماهی در برابر تنش های محیطی سبب بهبود میزان بقاء شود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، مخمر ساکارومایسیس، ماهی سوروم، شاخص های رشد.

شناسه : PH36

اثر باکتری های زیست یار بر برخی شاخص های خونی در ماهی زینتی *Astronotus ocellatus*

نوری فائقه ، فیروزبخش فرید f.n000@yahoo.com74

دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.

استادیار گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

به منظور بررسی اثر باکتری های زیست یار بر پارامترهای هماتولوژیک خون ماهیان زینتی، پروبیوتیک پروتکسین به مدت 2 ماه بر روی بچه ماهیان اسکار با میانگین وزن اولیه 0/12±4/92 گرم آزمایش شد. این آزمایش بصورت طرح کاملا" تصادفی در قالب 4 تیمار و 3 تکرار و 144 عدد بچه ماهی(در هر آکواریوم 12 عدد بچه ماهی) صورت پذیرفت. پروبیوتیک مورد نظر به غذای تجاری بیومار در سه سطح 0/15 ، 0/5 و 1 گرم به ازای کیلوگرم غذای خشک اضافه گردید. تیمار شاهد از جیره فاقد پروبیوتیک تغذیه شدند. نرخ تغذیه بر اساس 4٪ وزن بدن و 3 نوبت در روز انجام گرفت. خونگیری با قطع ساقه دمی انجام شد و در هر نمونه خون، تعداد گلبول های قرمز، گلبول های سفید، غلظت هموگلوبین و میزان هماتوکریت اندازه گیری شدند. براساس نتایج بدست آمده، تیمار آزمایشی حاوی 0/15 گرم پروبیوتیک به ازای کیلوگرم غذای خشک افزایش معنی داری($p<0/05$) از نظر تعداد گلبول قرمز، گلبول سفید و هماتوکریت در مقایسه با تیمار شاهد نشان داده است اگرچه تیمارهای آزمایشی حاوی 0/5 و 1 گرم پروبیوتیک نیز افزایش را نشان دادند اما این افزایش از نظر آماری معنادار نبود($p>0/05$). از نظر مقدار هموگلوبین بین تیمارهای 0/5 و 0/15 گرم پروبیوتیک به ازای کیلوگرم غذای خشک با شاهد اختلاف معنی داری مشاهده شده است($p<0/05$) ولی تیمار 1 گرم پروبیوتیک با تیمار شاهد اختلاف بارزی نشان نداده است($p>0/05$). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پروبیوتیک پروتکسین توانایی تاثیرگذاری بالایی بر فاکتورهای هماتولوژیک خون بچه ماهیان اسکار داشته و در بین سطوح مختلف بکار برده شده بهترین دوز موثر بر شاخص های خونی، سطح 0/15 گرم پروبیوتیک به ازای کیلوگرم غذای خشک می باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پروتکسین، هماتولوژی، اسکار

Effect of probiotic bacteria on some haematological parameters of ornamental fish of *Astronotus ocellatus*

Noori, F ., Firouzbakhsh, F f.n000@yahoo.com

Graduated From Collage of Agricultural and Natural Resources of Islamic Azad University, Sience and Research Campus, Tehran, Iran. Asistant professor, Department of Fisheries, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran .[2]

To evaluate the effect of probiotic bacteria on haematological parameters in fishes, probiotic protexin was tested on oscar(*Astronotus ocellatus*) fry with average weight 4.99±0.12 g, for two months. This experiment was conducted in a completely random design in four treatment and three replicates (12 aquqrium) and 12 fry per aquarium. Probiotic was supplemented with experimental diets (commercial feed- Biomar) in three levels 0.15, 0.5 and 1 gr probiotic per kg feed. The control treatment was fed on nonsupplemented diet. The rate of feeding was on the base of the 4 percent of body weight for 3 times a day. Blood sampling was taken from the caudal vein of apparently healthy fish and haematological parameters (RBC, WBC, haemoglobin and haematocrit were determined. Experimental treatment of 0/15 gr probiotic per kg feed showed significantly increasing ($p<0/05$) in RBC, WBC and haemotocrit compared to control treatment. However experimental treatments of 0/5 and 1 gr probiotic per kg feed showed increasing but it didnot have a significant($p<0/05$). The experimental treatments of 0.15 and 0.5 gr probiotic per kg feed showed significantly increasing($p<0.05$) in haemoglobin compared to control. but treatment of 1 gr probiotic did not have a significant difference compared to control($p>0.05$). The results indicated that probiotic protexin have the increase ability to influence on haematological parameters in oscar fry and the best effective concentration is level of 0.15 gr probiotic per kg feed.

Key words: probiotic, protexin, haematology, oscar

شناسه: PH37

پروبیوتیک ها در پرورش ماهی

شجاعی مسلم[*1]، دادور پوریا [2]، بهشتی روی سمیه [3]**

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح دام، دانشگاه شهید باهنر کرمان Shojai_moslem@yahoo.com

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[3]دانشجوی کارشناسی علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان

دانشگاه شهید باهنر کرمان

پروبوتیک ها باکتری های مفیدی می باشند که حیوان میزبان خود را علیه پاتوژن های باکتریایی مضر حفظ می کنند. بزرگترین هدف استفاده از پروبیوتیک ها در پرورش ماهی حفظ و یا بازسازی یک ارتباط بین میکروارگانیسم های پاتوژن و میکروارگانیسم های خودی تشکیل دهنده فلور میکروبی روده و پوست ماهی می باشد. هدف این مقاله ارزیابی مخلوطی از پروبیوتیک های باکتریایی به عنوان یک مکمل اضافه شده به آب ماهی ها تحت شرایط آزمایشگاهی و تعیین مقدار مفید استفاده از آن در آب ماهی می باشد. اثرات مواجهت کوتاه مدت و بلند مدت این مخلوط با ماهی در آب های جاری و شور مورد مطالعه قرار گرفته است و مطالعاتی جهت بررسی اینکه آیا استفاده از این پروبیوتیک ها باعث حفظ ماهی ها علیه پاتوژن ها می شود بطور گسترده ای انجام شده اند. نشان داده شده است که بسیاری از پروبیوتیک ها باعث بهبود فعالیت باکتری های مفید موجود در دستگاه گوارش ماهی می شوند و همچنین این میروارگانیسم ها با تولید ویتامین B_{12} باعث افزایش فعالیت دستگاه گوارش ماهی می شوند. بنابراین اضافه کردن پروبیوتیک ها به ماهی باعث یک تعادل مناسب در فلور میکروبی دستگاه گوارش و به موجب آن یک تغذیه و رشد مناسب و سلامت ماهی می شوند. مقدار مناسب استفاده از پروبیونیک ها در آب ماهی ها از طریق روش های آزمایشگاهی در طی یک آزمایش 24 ساعته با غلظت های 0، 4، 64 و 256 ppm و با یک دوره دو هفته ای جمع آوری نتایج تعیین شد. غلظت های بالغ بر 64 ppm جهت درمان ماهی های بیمار مناسب بودند و این در حالی بود که در غلظت 256 ppmیک مرگ و میر قابل ملاحظه ای مشاهده شد. در مرحله بعد این مخلوط با غلظت 64 ppm برای مدت 6 هفته بصورت هفته ای دو بار و یا دو هفته ای یک بار به ماهی ها عادت داده شد و هیچ مرگ و میری در طول آزمایش مشاهده نشد. یک نرخ رشد بالاتری در ماهی هایی که بصورت هفته ای دوبار مورد عادت پذیری قرار گرفته بودند در مقایسه با گروهی که مورد درمان قرار نگرفتند مشاهده شد و این در حالی بود که هیچ اختلاف معنی داری در ماهی های درمان شده بصورت دو هفته ای یک بار وجود نداشت. شمار سلول های باکتریایی کل (TCC) در آب در هر دو گروه مورد آزمایش در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی دار ی بالا بود. در آزمایش

بعد هر دو گروه توسط پاتوژن های باکتریایی در معرض عفونت قرار گرفتند و یک مرگ و میر بالاتری در گروه شاهد بدون استفاده از پروبیوتیک ها (55/8 در مقایسه با 40/4) مشاهده شد. بنابراین استفاده از پروبیوتیک ها باعث ایجاد یک مقاومت قابل ملاحظه ای در ماهی ها در برابر بیماری ها می شود و همچنین استفاده از پروبیوتیک ها در آب تانک ها و حوضچه ها از آنجایی که ترکیب آب باکتری های آب و املاح را تغییر می دهند باعث بهبود کیفیت آب و در نتیجه آن، روی سلامت ماهی تأثیر گذار می باشند.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک های باکتریایی، ماهی، مرگ و میر

Probiotics in Fish Farming

Shojaei M.[*1], Dadvar P.[2], Beheshtirooy S.[3]**

[1]MSc. Student of Animal genetic and breeding, Shahid Bahonar University of Kerman Shojai_moslem@yahoo.com

[1]MSc. Student of Animal Nutrition, Shahid Bahonar University of Kerman

[3]BSc. Student of Animal science, Shahid Bahonar University of Kerman

Shahid Bahonar University of Kerman

Probiotics are harmless bacteria that protect the host animal against harmful bacterial pathogens. The major purpose of using probiotics is to maintain or reestablish a favourable relationship between friendly and pathogenic microorganisms those constitute the flora of intestinal or skin mucus of fish. The aim of this paper has been to evaluate probiotic bacterial mixture as a water additive supplement to fish under experimental conditions and defining to what degree of this mixture is harmful to fish. The short-term and long-term effect of exposure to this mixture was studied in fish that kept in both tap and brackish water. The experimental study was devoted to see if use of these probiotic bacteria provided some protection against fish pathogens. In addition, many probiotics appear to improve the activity of beneficial bacterial species, already present in the digestive tract of fish. A number of microorganisms also produce vitamin B_{12}, which appears to increase the digestive performance of fish. Thus, administration of probiotics in fish may reestablish a good balance of the gut microflora and thereby contribute to an optimal nutritional, growth and health of the fish. Through experimental procedure, a safe dose was determined on a single 24 hrs treatment at different concentrations (0 ppm, 4 ppm, 64 ppm and 256 ppm) by two weeks post-treatment observation. Concentrations up to 64 ppm were found to be safe for treatment of fish. A significant instant mortality was found in fish subjected to a concentration of 256 ppm. In the next step a treatment with a water additive concentration of 64 ppm mixture was adopted as bi-weekly or fort-nightly, respectively for a period study of 6 weeks. No mortality occurred during the experiment. A significantly higher growth rate was obtained in fish treated bi-weekly with mixture as compared to untreated control fish, while no significant difference was observed in fish treated fort-nightly. The total bacterial cell content (TCC) of the water of the experimental tanks was found to be significantly higher in both treatment groups when compared to the untreated control tanks. The fish with or without treatment with mixture was challenged with cohabitants infected with the pathogenic bacteria. Challenged fish died at a high rate (55.8% in control and 40.4% in treated group). Thus, a significant improvement of disease resistance was noted in the fish treated and also Application of probiotics into the water of tanks and ponds may also have an effect

on fish health by improving several qualities of the water, since they modify the bacterial composition of the water and sediments.

Keywords: Probiotic Bacteria, Fish, Mortality

شناسه: PH38

کینتیک آفلاتوکسین زدایی لاکتوباسیلوس رامنوسوس

باقرزاده کاسمانی فرزاد*، کریمی ترشیزی محمد امیر

****دانشجوی دکتری تغذیه طیور، دانشگاه تربیت مدرس**

*****عضو هیات علمی دانشگاه تربیت مدرس**

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی هستند که توسط قارچهای رشته‌ای آسپرژیلوس فلاووس، پاراسیتیکوس و نومیوس تولید می‌شوند. این قارچها به عنوان آلوده کننده های معمول خوراک شناخته شده هستند. آفلاتوکسین B1 سمیترین نوع آفلاتوکسین و سم رایج در منابع خوراکی می‌باشد. بلع مایکوتوکسین‌توسط حیوانات منجر به بروز اثرات پاتولوژیکی متعدد و اغلب سرکوب سیستم ایمنی می‌گردد. خسارات اقتصادی آفلاتوکسین‌ها شامل کاهش مصرف خوراک، کاهش رشد روزانه، کاهش یکنواختی گله، افزایش ضریب تبدیل، کاهش وزن کشتار، کاهش تولید تخم مرغ، اندازه تخم مرغ، کیفیت پوسته، جوجه درآوری و افزایش نرخ مرگ و میر می‌باشد. روشهای موجود برای حذف آفلاتوکسین‌ها شامل تیمارهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی است و البته تاکنون هیچکدام از این روشها به تنهایی موثر و کارآمد نبوده است. روش بیولوژیکی به دلیل کم هزینه بودن و قابلیت استفاده آسان توجه محققان را به خود جلب نموده است. نکته کلیدی در این روش استفاده از میکروارگانیسم جهت کاهش مقدار آفلاتوکسین موجود در خوراک می‌باشد. اخیرا نقش باکتریهای جنس لاکتوباسلوس در حذف آفلاتوکسین‌ها مورد تاکید قرار گرفته است. لاکتوباسیلوس رامنوسوس از مرکز کلکسیون قارچها و باکتریهای سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. لاکتوباسیلوس پلانتاروم در دمای 37 درجه سلسیوس و در فواصل زمانی مختلف(0، 5/، 4، 12، 24 و 72 ساعت) به همراه آفلاتوکسین B1 اینگوبه شد و سپس باقیمانده سم در مایع رویی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک اندازه‌گیری شد. کاهش افلاتوکسین B1 به صورت درصد گزارش گردید.هدف از مطالعه حاضر ارزیابی توان کاهش آفلاتوکسین ها توسط لاکتوباسیلوس پلانتاروم و تفسیر آن در شرایط عملی بوده است. لاکتوباسیلوس پلانتاروم مورد استفاده در این آزمایش، با توجه به زمان انکوباسیون مقدار متفاوتی از آفلاتوکسین B1 را حذف نمود(19/41 تا 35 درصد). مکانیسم حذف آفلاتوکسین B1 توسط باکتریهای اسید لاکتیک به صورت تجزیه متابولیکی نبوده بلکه از طریق باند شدن این سم به دیواره سلولی

باکتریایی می‌باشد. اما مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا مکانیسم دقیق باند شدن و همچنین پایداری کمپلکس سم-باکتری سنجیده شود. به نظر می‌رسد که استفاده از این باکتری برای بعبود ایمنی زیستی منابع خوراکی و حذف مایکوتوکسین‌ها بسیار ضروریست.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، آفلاتوکسین، ایمنی زیستی

Aflatoxin Removal Kinetic of *Lactobacillus rhamnosus*

F. Bagherzadeh Kasmani and M.A. Karimi Torshizi*

Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

karimitm@modares.ac.ir

Aflatoxins (AFs) are toxic secondary metabolites produced by filamentous fungi (*Aspergillus flavus, A. parasiticus and A. nomius*) which are well known as contaminants of agricultural products from farm to table. AFB_1 is recognized as the most toxic AF and is a common contaminant of feed stuffs. Ingestion of mycotoxin by animals may result in pathology and often in immunosuppression. Economic losses by AFs are: feed refusal, reduced daily weight gain and flocks uniformity, impaired FCR, lower slaughter weight, decline on egg production, egg size, egg shell quality, hatchability and higher mortality rates. Available interventions for AFs risk elimination are physical, chemical and biological treatments, while none of them is proved as sole effective and practical method yet. The biological methods take researcher attentions due to their easy usage and affordable processes. The key note in these methods is the choice of microorganisms (MO) to diminish AFs in contaminated products. Recently the role of lactobacilli bacteria as AFs reducer MO were emphasized.

Lactobacillus rhamnosus originally obtained from Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST). *L. rhamnosus* incubated at 37°C for different time intervals (0-, 0.5-, 4-, 12-, 24-, and 72-h) with aflatoxin B_1 and then the toxin residue in the supernatant was measured using thin layer chromatography (TLC). The reduction in AFB1 value was attributed to removal efficacy of strain and expressed as percent of AFB1 reduction.

The present study was carried out to assess the AFs removal potential of *L.rhamnosus* and to anticipate its efficiency in practical situations.

The strain was observed to possess variable toxin-binding ability in the range of 19.41 to 35.00%. The mechanism of AFB1 removal by lactic acid bacteria has been suggested as binding of AFB1 to the bacterial cell wall rather than metabolic degradation, however, further studies are needed to characterize the binding mechanisms and *in vivo* bacteria-toxin complex stability. It seems the application of this phenomenon in the removal of mycotoxins from contaminated feed is urgently needed to improve the safety of feed supply.

Key words: probiotic bacteria, lactobacillus, aflatoxin, toxin binding**,** feed safety

شناسه: PH39

تاثیر پروبیوتیک بیوپلاس2 ب، بر روی فراسنجه های بیوشیمیایی خون در بوقلمون

علیرضا فانی[1]، رامین سلامت دوست[2] ، احد ایازی[3]، نسیم صدیق[4]، حمید حمیدیان[3]**

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، 2- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر، 3- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی، 4- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سلماس

به منظور مطالعه تاثیر پروبیوتیک بیوپلاس2ب، بر فراسنجه های بیوشیمیایی خون بوقلمون، آزمایشی با 72 قطعه جوجه بوقلمون در ایستگاه تاتار انجام شد. طرح آزمایشی عبارت از فاکتوریل 2×4 بر پایه طرح کاملا تصادفی با 4 جیره غذایی بر اساس توصیه NRC (1994) برای بوقلمون های 20- 16 هفتگی تنظیم گردید جیره ها از لحاظ انرژی و پروتئین یکسان بود و فقط از نظر میزان پروبیوتیک متفاوت بودند (شاهد، 0/05، 0/10، 0/15 درصد) که به گروه های مختلف تغذیه شد. نتایج حاصل از تجزیه داده ها نشان داد که اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک، جنس و اثر متقابل آنها بر روی کلسیم، کلسترول و تری گلیسیرید خون غیر معنی دار است. ولی میزان پروتئین، کلسترول، تری گلیسیرید و کلسیم خون جوجه بوقلمون ها در دوره های مختلف خونگیری (120 روزگی و 150 روزگی) تفاوت معنی داری داشتند.

واژگان کلیدی : بوقلمون بومی، پروبیوتیک، فراسنجه های بیوشیمیایی خون

The Effect of BioPlus-2 B Probiotic on Turkey Blood Biochimical Parametres

In order to study the effect of probiotic biopuls 2B on biochemical parameters of turkey an experiment was conducted using 72 three months, aged turkey chicks in Tatar research station for turkey. Experimental design was factorial 2×4 based on (CRD). Four ration each containing different levels of probiotic (control, 0.05, 0.10, 0.15 Percent) were prepared using NRC(1994) and fed to groups. All rations had the same protein and energy content and suitable for 16- 20 weeks aged turkeys. Results of data analysis showed that effects of different levels of probiotic, Sex and contraction of them on

blood calcium, cholesterol and triglyceride were not significant. However levels of protein, calcium, cholesterol and triglyceride were significantly different between two sampling times (120 and 150 days old).

Key words: Native turkey, Probiotic, Performance, Biochemical parameter.

شناسه: PH40

بررسی اثر قطع پری‌بیوتیک (فرماکتو) روی PH روده کوچک، شمار جمعیت باکتریایی مفید لاکتوباسیلوس سکوم در جوجه‌های گوشتی

قربانپور کاظم [1*]، خسروی مهدی [2]، وکیلی رضا [1] ، جمشیدی عبدالله[1]**

1- گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر k.ghorbanpour@yahoo.com79

2- دانشجوی دکتری ژنتیک و اصلاح نژاد دام (عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر)

در این آزمایش تعداد 192 قطعه جوجه گوشتی یکروزه سویه تجاری راس در یک طرح کاملاً تصادفی در 4 تیمار (4 تکرار و 12 قطعه جوجه در هر تکرار) با یکی از جیره‌های دارای سه سطح پری‌بیوتیک فرماکتو شامل جیره فاقد فرماکتو، جیره حاوی فرماکتو در سطح (0/1 درصد مخلوط در جیره یا 1 کیلو در تن) و همچنین جیره حاوی فرماکتو در سطح (0/2 درصد مخلوط در جیره یا 2 کیلو در تن) به گونه‌ای که تیمار 1 جیره فاقد فرماکتو، تیمار 2 جیره حاوی 2 کیلو در تن فرماکتو تا سن 21 روزگی و پس از آن جیره فاقد فرماکتو تا آخر دوره، تیمار 3 جیره حاوی 2 کیلو در تن فرماکتو تا سن 21 روزگی و پس از آن جیره حاوی 1 کیلو در تن فرماکتو تا سن 30 روزگی و پس از آن جیره فاقد فرماکتو تا آخر دوره و تیمار 4 جیره حاوی 2 کیلو در تن فرماکتو تا سن 21 روزگی و جیره حاوی 1 کیلو در تن تا آخر دوره تغذیه شدند. در سن 10 روزگی از هر تیمار یک جوجه انتخاب و مورد کشتار قرار گرفتند و از محتویات روده باریک آنها برای اندازه‌گیری PH نمونه‌گیری شد و همچنین در سن 21، 30 و 42 روزگی از هر تکرار در هر تیمار به صورت تصادفی یک جوجه انتخاب و کشتار شد، PH و جمعیت باکتریایی مفید لاکتوباسیلوس اندازه‌گیری شد. طبق نتایج به دست آمده در این آزمایش میزان PH در سنین 10، 30 و 42 روزگی کاهش و جمعیت باکتریایی مفید لاکتوباسیلوس سکوم در سنین 21، 30 و 42 روزگی افزایش یافت (P< ٪5).

از این تحقیق این طور استنتاج می‌شود که افزودن فرماکتو موجب کاهش میزان PH و افزایش شمار جمعیت باکتریایی مفید لاکتوباسیلوس شد.

واژه‌های کلیدی: پری بیوتیک، فرماکتو، PH، لاکتوباسیلوس

The study of removing the prebiotic (Fermacto) on intestinal PH, Number of useful bacteria luctobacillus of secom on broiler chicks.

K. Ghorbanpour [1], M. Khosravi[2], R. Vakili[1], A. Jamshidi[1]

1- Animal Science department, Azad University of Kashmar

k.ghorbanpour@yahoo.com

2- Ph.D. student of Animal Science (Yong Researchers Club Azad University of Kashmar)

Mahdi_khossravi@ yahoo.com

In this study 192 one day broiler of ross were selected randomly in 4 treat (4 replicates and 12 chicken in every replicates)

We feed them in the level of probiotic fermacto. The first food without fermacto, the second contained fermacto (0.1% in total or 1^{kg} in every ton) and the last which was contained fermacto (0.2% in total or 2^{kg} in a ton). In away treat 1 that was without fermacto, treat 2 contained 2^{kg} in a ton of fermacto until 21 day and then they were feed by food was without fermacto, treat 3 contained that 2^{kg} in one ton of fermacto until 21 day and then they were feed by food which was contained that 1^{kg} in one ton until they were 30 day, then their food didn't have any fermacto until the end of the period, and treat 4 contained 2^{kg} in every ton to 21^{kg} day and the food contained 1^{kg} in a ton until the end of the period. One chicken was selected when it was 10 day in every treat and was killed.

The PH in the remain of food in it's intestine was measured and in 21 , 30 and 42 day, from every replicates in every treat one chicken was selected randomly, too and was killed. The PH and number of useful bacterial loctobacillus was measured.

In another the result of this study show that adding fermacto to the chicken food caused PH in 10 , 30 and 42 day shows a decrease but the number of the useful bacterial lactobacillus secom in 21 , 30 and 42 day was increased ($P < 5\%$).

The we can say that adding fermacto caused decreasing PH and increasing the useful lactobacillus bacteria.

Key Words: prebiotic , fermacto , PH , lactobacillus.

شناسه: PH41

بررسی اثر پروبیوتیک پریمالاک بر روی برخی فاکتورهای تولید مثلی و رشد در ماهی پلاتی (*Xiphophorus maculatus*)

عباسعلی حاجی بگلو [*،1] ، محمد سوداگر [2]**

دانشجوی کارشناسی ارشد. رشته تکثیر و پرورش آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان **haji2005begloo@yahoo.com**

استادیار گروه شیلات. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

مقدمه، هدف: اخیرا تحقیقات نسبتا زیادی در زمینه نقش پربیوتیک ها در موجودات آبزی صورت گرفته است. اما در زمینه عملکرد پروبیوتیک ها در ماهیان زینتی به ویژه در مورد فاکتورهای تولید مثلی تحقیقات اندکی انجام شده است.

در این تحقیق تأثیر پروبیوتیک پریمالاک بر روی برخی فاکتورهای تولید مثلی و رشد در ماهی پلاتی مورد آزمایش قرار گرفت. این آزمایش در قالب 4 تیمار با 3 تکرار طراحی شد. برای این منظور ماهیان پلاتی باکره با سن 20 هفتگی با 4 رژیم غذایی شامل: **A** (شاهد)، **B**، **C** و **D** که به ترتیب حاوی 0، 0/4، 0/9 و 1/4 گرم پروبیوتیک پریمالاک در هر کیلوگرم جیره بود به مدت 26 هفته تغذیه شدند. ماهی ها با تراکم 10 قطعه ماهی ماده و 3 قطعه ماهی نر در هر آکواریوم (با ابعاد 30×40×60 سانتی متر مکعب) روزانه به میزان 3 درصد وزن بدن و در 3 نوبت غذادهی شدند. در پایان دوره آزمایش فاکتورهای مختلف تولید مثلی و رشد برای ماهیان ماده و بچه ماهیان اندازه گیری و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج آزمایش نشان داد که شاخص گنادوسوماتیک در سه گروه آزمایشی به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بود (**P**<0/05). بین تیمارهای **C** و **D** از نظر میزان باروری، میانگین تعداد و درصد بقای بچه ماهیان متولد شده اختلاف معنی داری مشاهده نشد (**P**>0/05) اما این مقادیر به طور معنی داری بیشتر از دو تیمار دیگر بودند (**P**<0/05). طول، وزن نهایی و درصد بقای مولدین ماده در گروه شاهد اختلاف معنی داری با سایر گروه ها نداشت (**P**>0/05). به علاوه بالاترین میزان طول و وزن بچه ماهیان متولد شده در گروه **D** مشاهده شد.

کلمات کلیدی: پریمالاک، پروبیوتیک، فاکتورهای تولید مثلی، ماهی پلاتی

Growth and reproductive performance of female platy, *Xiphophorus maculatus*, fed probiotic (Primalac)

Hajibeglou Abasali [*,1], Sodagar Mohamad[2]**

M.Sc. Student of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources haji2005begloo@yahoo.com

Assist. Prof. of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Introduction: Most recently, probiotics has been studied for enhancing growth rate and disease resistance in fish but work on the effects of probiotics on the reproductive performance of fish, especially on ornamental fish, are lacking.

Material and methods: A study to determine the effects of dietary supplementation with probiotic (Primalac) on the growth and reproductive performance of platy, *Xiphophorus maculatus*, was carried out. Virgin platy aged 20 weeks were used in the experiment. There were four treatments, including a control (A), each consisting of three replicates of 10 females and 3 males/replicate, each reared in glass aquarium (60 × 40 × 30 cm^3). Fish were fed under four regimes, 0.0 (control), 0.4 (B), 0.9 (C) and 1.4 (D) Primalac kg^{-1} diet with 3% of their body weight daily in three split doses for 26 weeks.

Results and discussion: The results showed that gonadosomatic index was significantly ($P<0.05$) higher in the three experimental groups compared to the control group. Though the fecundity of female broodstock, fry production and survival rate of fry between C and D groups were not significantly different ($P>0.05$), these values were significantly ($P<0.05$) higher than control and D_2 groups. No significant differences ($P>0.05$) in survival rate, weight and length of female broodstock were observed between control and experimental groups. Moreover, the highest weight and length of fry was observed in D group.

Key words: Primalac, probiotic, reproductive performance and *Xiphophorus maculatus*

شناسه: PH42

مطالعه اثرات حفاظتی پروبیوتیک ساکارومایسز بولاردی در جلوگیری از اسهال سالمونلایی در رت

صالحی الهام[1]، مروتی شریف آباد مجید[1]*، مهرنیا محمد امین[1]**

اعضاء هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر*dr.salehi88@yahoo.com.80

سالمونلوز یکی از بیماریهای عفونی در تمام گونه‌های حیوانات است که توسط گونه‌های مختلف سالمونلا ایجاد شده و تظاهر بالینی آن به صورت سپتیسمی یا اسهال می‌باشد. بسیاری از تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که برخی پروبیوتیکها مانند ساکارومایسز بولاردی می‌توانند از ظهور باکتریهای انتروپاتوژنیک مانند سالمونلا در شرایط غیر زنده جلوگیری نماید. همچنین با کمک این مخمرها می توان از بروز تغییرات پاتولوژیک این باکتری در شرایط زنده و داخل بدن موجودات زنده نیز جلوگیری کرد. این مطالعه در حقیقت اثرات حفاظتی ساکارومایسز بولاردی را بر ضایعات ناشی از سالمونلا در رت بیان می‌کند. به این منظور 30 عدد رت نر خریداری شده به سه گروه A و B و C تقسیم شدند. رتهای گروه B و C هر کدام به ترتیب 1 سی سی محلول حاوی 10^7 و 10^8 مخمر ساکارومایسز، به مدت 5 روز به ترتیب به صورت دهانی دریافت نمودند. در حالیکه حیوانات گروه A فقط 1 سی سی سالین نرمال به عنوان گروه کنترل دریافت نمودند. به همه رتها در روز پنجم یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^7 باکتری سالمونلا تیفی موریوم تجویز شد . در روز دهم بعد از تجویز باکتری، تمامی رتها به روش انسانی معدوم شدند . نمونه های بافتی مناسب از روده آنها تهیه و جهت ثبوت، بافت در فرمالین 10٪ قرار داده شد و به منظور تهیه مقاطع بافتی مناسب به آزمایشگاه ارسال گردید. در پایان ، نتایج حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک روده با استفاده از آزمون آماری fisher exact test به طور توصیفی مورد بررسی قرار گرفت . این نتایج نشان داد که رتهای گروه کنترل دچار اسهال شده و در روده آنها تجمع سلولهای آماسی در ناحیه زیرمخاط همراه با افزایش ترشح موکوس مشاهده گردید. نتایج مطالعه حاضر بیان می‌کند که ساکارومایسز بولاردی دارای اثرات حفاظتی ناشی از ضایعات سالمونلا تیفی موریوم در بدن رتها می باشد که نتایج حاصل از آزمونهای هیستوپاتولوژیک نیز این موضوع را تایید می‌نماید.

واژه های کلیدی: روده، هیستوپاتولوژی، ساکارومایسز بولاردی، سالمونلا تیفی موریوم

The study of protective effects of saccharomayces boulardii probiotic on salmonella typhimurium Intestine lesions in rat

salehi,E[1]. Morovati sharif abad,M.[1]*, Mehrnia,M.A.[1]**

1- Department of veterinary medicine, Islamic Azad University, shushtar branch, shushtar, Iran.

*. Dr.salehi88@yahoo.com

Salmonellosis is an infectious disease of all animals species caused by a number of different species of salmonellae and manifested clinically by preacute septicemia or enteritis. many recent investigation suggested that some probiotics such as saccharomayces boulardii can inhibite multiplicate of enteropathogenic bacteria such as salmonella invitro and it is possible comprevent of pathological changes caused by this bacteria invivo.

This study was conducted to investigate the protective effects of saccaromyces boulardii on the pathologic lesions of salmonella typhimurium in rat.

Thirty male rats were divided in to three group (A,B,C).Rats in group B and C received 1 ml of saline contained 10^7 and 10^8 CFU of Saccharomyces boulardii orally for 5 days. Respectively animals in group A (as control) received only 1 ml normal saline.on day five all animales were challenged orally with 10^7 Salmonella typhimurium.on day 10 ,firstly all rats challenged with bacterium then all animales were euthanised . specimens of intestine were fixed in 10% buffered formalin solution for histological examination and translated to pathological laboratory.The result of intestine histopathologic examination were investigeted by fisher exact. test . The result indicated that all control groups show diarrhea and infiltration of inflamatory cells in mocosa compared with rats in experiment groups that didn't show any marked pathological changes in the intestine.The result of this study indicate that sacharomyces boulardii has protective effect on salmonella typhimurium infection in rat and histological examination confirm this results.

Keywords:Intestine,histopathology, saccharomayces boulardii, salmonella typhimurium

شناسه: PH43

برسی روش های تجویز پروبیوتیک پروتکسین در هچری بر برخی فراسنجه های خونی و عملکرد جوجه های گوشتی

رشیدی علی اصغر ❋، لطفی پویا ❋❋

دانش آموخته کارشناسی اسلامی واحد کاشمر(ali.rashidi.1749@gmail.com)❋

دانشجوی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کاشمر(pooya_lotfi2002@yahoo.com) ❋❋

این آزمایش با هدف برسی تاثیر روش های مختلف تجویز پروبیوتیک پروتکسین در بر غلظت برخی فراسنجه های خونی و عملکرد جوجه های گوشتی انجام شد.90 قطعه جوجه گوشتی سویه راس 308 به سه تیمار تقسیم شدند.یک تیمار شاهد و دو تیمار روش های مختلف تجویز پروبیوتیک در هچری، شامل تزریق به تخم مرغ و افشانه. در هر تیمار 3تکرار و در هر تکرار 10 جوجه قرار داشت. نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه آماری شد. خوراک مصرفی، وزن بدن و ضریب تبدیل تا دوهفتگی هر هفته محاسبه شد.در هفته دوم میزان کلسترول ، HDL و LDL خون 6 پرنده از هر تیمار به صورت آنزیماتیک CHOD-PAD مورد اندازه گیری قرار گرفت. میزان مصرف خوراک و افزایش وزن تحت تاثیر تیمار ها قرار نگرفته بود. بالاترین ضریب تبدیل درتیمار شاهد مشاهده شد و تفاوت معنی داری بین سایر تیمار ها مشاهده نشد. کمترین میزان کلسترول خون به ترتیب در تیمار افشانه، تزریق تخم مرغ و شاهد مشاهده شد اما تفاوت آن معنی دار نبود. بالاترین میزان HDL در تیمار افشانه مشاهده شد و تفاوت آن با تیمار تزریق تخم مرغ و شاهد معنی دار بود($P<0.05$). بالاترین میزان LDL به ترتیب در تیمار شاهد، تزریق تخم مرغ و افشانه مشاهده شد اما تفاوت معنی داری در بین تیمارها وجود نداشت.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک پروتکسین، جوجه گوشتی، عملکرد، فراسنجه های خونی، هچری

Studying the methods of probiotic Protoxin prescription in hatchery on some blood parameters and performance of broiler chickens

Rashidi,A. A* Lotfi, P**

Postgraduate in Animal Science from Islamic Azad University of kashmar (ali.rashidi.1749@gmail.com)*, M.S.C Student in Animal Science from Islamic Azad University of Kashmar (pooya_lotfi2002@yahoo.com)**

This experiment has been made with the aim of studying the effect of different methods of probiotic Protoxin prescription in hatchery on rate of some blood parameters and performance of broiler chickens. 90 broiler chicken Ross 308 were divided in three treatments. One control and two experienced different methods of probiotic prescription in hatchery including injection to the egg and spray. There were three replication in each treatment and 10 chickens in each replication. The results were statistically analyzed in the form of a completely randomized design. Feed intake, body weight and feed convention measured weekly to the second week. In second week cholesterol, HDL, LDL of 6 bird's blood from each treatment was measured by enzymatic method of CHOD-PAD. Feed intake, body weight no affected by treatment. The highest rate of feed convention observes in control treatment and there was no difference among of other treatment significantly. The lowest rate of blood cholesterol observe in spray, injection to the egg and control treatment respectively and showed significant difference with control and egg injection treatment ($P<0.05$). The highest rate of LDL observes in control, egg injection and spray treatment respectively but had no significant difference among treatment.

Keywords: probiotic Protoxin, broiler chicken, performance, blood parameters, hatchery

شناسه: PH44

اثر افزودن پروبیوتیک Protexin در جیره غذایی شاه میگوی آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) بر شاخصهای رشد و بازماندگی

ساجدی راد، امیر [1]،*، ؛ ولی پور، علیرضا [2] ؛ زمینی، عباسعلی [3] و حیات بخش، محمد رضا [4]**

[1، 3 و 4] گیلان ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان صندوق پستی: 1616 amir_sajedi61@yahoo.com

[2] گیلان ، بندر انزلی، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی کشور، ایستگاه تحقیقات شیلاتی سفید رود، صندوق پستی: 66

این تحقیق به منظور ارزیابی اثر سطوح مختلف پروبیوتیک **Protexin** در جیره غذایی **Isonitrogenous** و**Isoenergetics** بر روی رشد و بازماندگی ***Astacus leptodactylus*** انجام شد.

تیمارهای غذایی شامل سطوح 0 ، 1 و 3 گرم در کیلوگرم غذا بودند. این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی بود. هر تیمار متشکل از 3 تکرار بوده و جمعاً در 9 مخزن پرورش انجام شد. طول دوره آزمایش طی یک برنامه 8 هفته ای انجام شد و شاه میگوها در مخزنهای فایبرگلاس با ظرفیت 100 لیتری که دارای جریان هوای دائمی بودند و تعویض آب به صورت روزانه صورت میگرفت، نگهداری شدند. متوسط وزن اولیه موجودات 0/74± 23/05 گرم بود. نتایج نشان داد که با افزایش سطح پروبیوتیک در جیره های آزمایشی شاخصهای رشدی ***Astacus leptodactylus*** در رابطه با افزایش وزن و شاخص رشد ویژه ، بهبود یافته و بین تیمار فاقد پروبیوتیک و تیمار پروبیوتیک **3gr/kg** اختلاف معنی داری را نشان داد(**P<0.05**).

همچنین اختلاف ضریب چاقی و درصد بازماندگی شاه میگوهای آزمایشی در تیمارهای آزمایشی مختلف که با سطوح مختلف پرو بیوتیک تغذیه شده بودند معنی دارنبود(**P<0.05**).

لغات کلیدی: *Astacus leptodactylus*، تغذیه، پروبیوتیک، Protexin ، رشد

A study of Protexin Probiotic Increasing Effect of Diet on Growth and Survival of *Astacus leptodactylus*

Sajedi Rad, Amir [1*,], Valipour, Alireza [2], Zamini, Abbasali [3] and Hayatbakhsh, Mohammad Reza [4]**

amir_sajedi61@yahoo.com

[1,3 and 4] Islamic Azad University Branch of Lahijan, P.O.Box 1616, Guilan, IRAN

[2] Aquaculture Institute (Inland Waters), Bandar Anzali, P.O. Box 66, Gilan, Iran

The research is conducted to assess the effect of different levels of probiotic of Protexin in Isonitrogenous and Isoenergetics diets on growth and survival of *Astacus leptodactylus*. Experimental diets were inclusive 0 ، 1 and 3 g/kg food. The test followed a Randomized complete design. Each treatment organized with 3 replicates and totally 9 rearing tanks involved. The period of test being planned 8 weeks and the test organism housed in fiber-glass tanks of 100 l capacity with flowing water and aeration in tanks are supplied. The mean initial size of animals was 23.05 ± 0.74 g. The results showed that with increment of probiotic level in experimental diets the indices of growth of *Astacus leptodactylus* concerning weight gain and specific growth rates being improved, as difference of diets without and 3 g/kg Protexin were significant ($p<0.05$). Also, there was not significant differences in condition factor and survival rate of test animals fed with experimental diets ($p<0.05$).

Keywords: *Astacus leptodactylus,* Nutrition, Probiotic, Protexin, Growth

شناسه: PH45

کاربرد پروبیوتیک در قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM) Rainbow trout ، تأثیر در عملکرد رشد و بازماندگی

حبیب اللهی رقیه*[1]، سوداگر محمد[2]، حسینی سید عباس[3]، کریم زاده صادق[4]**

دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات – دانشکده شیلات – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان Habibolahi_roghaieh@yahoo.com

2 و3 – عضو هیأت علمی – دانشکده شیلات – دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان – صندوق پستی 386-45165.

4- عضو هیأت علمی مؤسسه آموزش عالی رودکی تنکابن

آبزی پروری یک فعالیت اقتصادی مهم در برخی از کشورها از جمله ایران می باشد. اخیراً در آبزی پروری، توجه مهمی به استفاده از باکتری های پروبیوتیکی برای افزایش عملکرد رشد و همچنین بهبود کیفیت آب شده است. به منظور بررسی تأثیر پروبیوتیک تجاری پریمالاک(lactobacillus *acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecium*, *Bifidobacterium thermophium*) بر برخی از شاخص های رشد و بازماندگی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM)، آزمایشی به مدت ۱۰ هفته در مرکز تحقیقات آبزی پروری دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. بدین منظور پروبیوتیک پریمالاک به جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلا در سه سطح 0.4، 0.9 و 1.4 گرم بر کیلوگرم جیره و گروه شاهد بدون پروبیوتیک اضافه گردید. آزمایش درون تانک های فایبر گلاس 500 لیتری که با 300 لیتر آب پر شده بود در 3 تکرار انجام گرفت. تعداد 70 قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (متوسط وزن۰.۰۱٤±٦.٦٥) به طور تصادفی درون تانک ها ذخیره سازی و روزانه در ٤ نوبت و به میزان ٤درصد وزن بدن تغذیه شدند. در شروع آزمایش و هر ١٤ روز طول و وزن ماهیان اندازه گیری و ثبت شد. در پایان آزمایش فاکتور های رشد و بازماندگی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که شاخص‌های رشد بچه ماهیان قزل آلا (ضریب رشد

ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR)، فاکتور وضعیت (CF)، کارایی غذا، افزایش وزن و تولید خالص) در بین تیمار شاهد نسبت به دیگر تیمارها اختلاف معنی دار نداشت اما بازماندگی در ماهیان تغذیه شده با مکمل های پروبیوتیکی در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بود ($P<0.05$). به عنوان یک نتیجه، پروبیوتیک پریمالاک در پرورش قزل آلای رنگین کمان در بهبود عملکرد رشد تأثیر ندارد اما می تواند بازماندگی را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، شاخص های رشد، بازماندگی، قزل آلای رنگین کمان

Probiotic application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss WALBAUM*), Effect on growth performance, survival

Habibollahi roghaieh[1]*, sudagar mohammad[2], hoseini seid abbas[3], karimzade sadegh[4]**

1-MSc student- Fisheries Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O. Box 45165-386, Gorgan, Iran

2,3 – Fisheries Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, P.O. Box 45165-386, Gorgan, Iran

4- Tonekabon, rodaki higher education institue

Aquaculture has become an important economic activity in many countries, includig Iran. Recently in aquaculture, the use of probiotic bacteria to enhance the growth performance and to also improve the quality of water has received considerable attention. To evaluate the effects of the commercial probiotic on the growth performance and survival rate in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* WALBAUM) experimental carried out at the Aquaculture research complex Gorgan University of agricultural science and natural resources for 10 weeks. Probiotic was introduced in diets at three different levels, (T1: 0.4 g, T2: 0.9gr, T3: 1.4gr/kg feed) and their effects compared with those of control diet containing no probiotic.

The feeding experiment was conducted in 500-L fibreglass tanks that filled with 300 L water in the triplicate. Each tank was randomly stocked with 70 fish (mean initial weight: 6.65±0.14gr) and fishes were fed four times daily and daily feeding rate was about 4% of total body weight(g). At the beginning of experiments and every 14 days,), determined weight and total length all fish. Growth and survival index were analyzed at the end of experiment. The results show that growth performance, body weight increase, weight gain, specific growth rate, feed conversion ratio, feed efficiency and condition factor were not significantly different among treatments and control but survival rate were significantly higher in fish maintained on the probiotic-supplemented diet compared with those on the control diet ($P<0.05$) . As a result primalac probiotic in *Oncorhynchus mykiss* culture has no effect in improve growth performance but it can increase survival rate.

Keywords: probiotic, growth performance, survival, *Oncorhynchus mykiss*

شناسه: PH46

به کارگیری رقم پروبیوتیک برای بهبود وضعیت سیم دریایی در طول رشد

قزوینی آذین[**1]، تیهو مرتضی[2]، میرزایی هانیه[3]**

1ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان دانشکده منابع طبیعی ، گروه شیلات ، لاهیجان ، ایران ، صندوق پستی 1616 .

2و 3 ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان ، دانشکده علوم پایه ، گروه میکروبیولوژی ، لاهیجان ، ایران ، صندوق پستی 1616

دو رقم باکتریاییLactobacillus fructivorans (AS178) که از روده سیم دریایی بالغ جدا شده بود و Lactobacillus plantarum (906) که از مدفوع انسان جدا شده بود به طور همزمان در طول رشد و نمو سیم دریایی با استفاده از Brachionus plicatilis و یا Artemia salina و غذای خشک به عنوان حامل به کار گرفته شدند. به کارگیری پروبیوتیک بر کلونی سازی روده تاثیر گذاشت. در 32 روز پس از خارج شدن از تخم (p. h) ، L.fructivorans در روده وجود نداشت اما به کارگیری پروبیوتیک باعث کلونی سازی L.plantarum گردید. در 63 روز پس از خارج شدن از تخم ، L.fructivorans در گروه کنترل نیز مشاهده گردید. به علاوه زمانی که شرایط محیطی مناسب در دستگاه معدی- روده ای پس از دگردیسی ایجاد گردید ، رقابت میان L.plantarum و L.fructivorans ایجاد گردید در روز 86 پس از خارج شدن از تخم ، L.plantarum با L.fructivorans که در مقایسه با گروه کنترل بسیار افزایش یافته بود جایگزین گردید. در گروهی که در آن از پروبیوتیک استفاده شده بود ، منجر به کاهش قابل توجه مرگ و میر لارو و بچه ماهی گردید.

لغات کلیدی : افزودنی های خوراکی ، ریزگیاهان روده ، کلونی سازی روده ای باکتری اسید لاکتیک ، پرورش لارو ، غذای زنده.

شناسه: PH47

اثر سطوح مختلف پروبیوتیک بر عملکرد جوجه‌های گوشتی

فلکی مرضیه[*1]، شمس شرق محمود[2]، دستار بهروز[2]، زره داران سعید[2] و خمیری مرتضی[3]

کارشناس ارشد علوم دامی- تغذیه دام از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

استادیار گروه علوم دامی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

استادیار گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

به منظور مطالعه سطوح مختلف پری‌بیوتیک و پروبیوتیک بر عملکرد جوجه‌های گوشتی آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با 480 قطعه جوجه خروس شامل 6 تیمار آزمایشی با 5 تکرار انجام گردید. فاکتور اول، 3 سطح فرمکتو (بدون فرمکتو، 1 کیلوگرم و 2 کیلوگرم فرمکتو در هر تن جیره) و فاکتور دوم 2 سطح پریمالاک (بدون پریمالاک و 900 گرم پریمالاک در هر تن جیره) بود. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که افزودن پریمالاک و مکمل سازی جیره با 2 کیلوگرم فرمکتو سبب افزایش معنی‌دار وزن زنده، وزن لاشه و درصد سینه شد ($P<0/05$) به طوری که در مقایسه با گروه شاهد عملکرد طیوری که جیره‌شان حاوی این افزودنی‌ها بود دارای وزن لاشه بالاتری بود. همچنین افزودن فرمکتو و پریمالاک به جیره جوجه‌های گوشتی سبب کاهش نسبی درصد چربی حفره بطنی و افزایش کیفیت لاشه گردید. علاوه بر آن، از آنجایی که در این تحقیق هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیکی به خوراک افزوده نشده بود، می‌توان با اطمینان اظهار داشت که با مصرف این محصولات، سلامت مصرف کننده از خطرات ناشی از بجا ماندن بقایای آنتی‌بیوتیکی در محصولات دامی در امان خواهد بود.

کلمات کلیدی: پریمالاک، فرمکتو، عملکرد، جوجه‌های گوشتی

Effect of Different Levels of probiotic on performance of broiler chicks

M. Falaki[1], M. Shams Shargh[2], B. Dastar[2], S. Zerehdaran[2] and M. Khomairi[3]

1- M.Sc, Dept. of Animal Science, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran

2- Assistant Prof. Dept. of Animal Science, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran

3- Assistant Prof. Dept. of Food Science, Gorgan University of Agriculture Science and Natural Resources, Iran

In order to studying the effect of different levels of prebiotics and probiotics on broiler's performance, the experiment carried out in a factorial design including 480 Ross male broiler chicks divided into six groups with 5 replicates. There were three levels of Fermacto (without Fermacto, 1 and 2 (kg/ton) of Fermacto) and two level of Perimalac (without Perimalac and 900 (gr/ton) of Perimalac). The results showed that using 1kg/ton of Fermacto and 900gr/ton of Perimalac increased carcass weight and carcass and breast percentage ($p<0.05$). Chicks fed diet containing feed additive (Primalac and Fermacto), had higher carcass weight than control diet. In addition, application of Fermacto and Primalac relatively reduced the percentage of abdominal fat in carcass and increased the quality of broiler's carcass. On the other hand, it can declare that with use of these products, that no supplemented with any antibiotic, protect consumers health from risks of antibiotics residues in animal products and the negative effect on human health.

Keywords: Primalac, Fermacto, performance, Broiler chickens

شناسه: PH48

بررسی اثر پروبیوتیک، پربیوتیک، اسید آلی و آنتی بیوتیک بر عملکرد و جمعیت اشرشیاکلی در ایلئوم جوجه های گوشتی

سید حامد رضوی[1]- مهدی قادری جویباری[2]- حبیب اقدم شهریار[3]- یحیی ابراهیم نژاد[3]- علیرضا احمد زاده[3]- سعید گلی[1]

[1] کارشناس ارشد علوم دامی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد شبستر **hamed1985razavi@gmail.com**

[2]کارشناسی ارشد علوم دامی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان واحد قائم شهر

[3]گروه علوم دامی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد شبستر

پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر پروبیوتیک، پربیوتیک، اسید آلی و آنتی بیوتیک ویرجینیامایسین بر عملکرد و جمعیت اشرشیاکلی در ایلئوم جوجه های گوشتی طراحی و مورد اجرا قرار گرفت. در این پژوهش که در غالب طرح پایه کاملا تصادفی به اجرا در آمد، از 5 تیمار و 4 تکرار استفاده شد که در هر واحد آزمایشی 15 قطعه مخلوط نر وماده جوجه یکروزه گوشتی ار سویه تجاری راس 308 نگهداری شد. پارامتر های مورد اندازه گیری شامل: سرانه خوراک مصرفی، سرانه افزایش وزن و ضریب تبدیل غذایی در سه دوره تغذیه ای آغازین، رشد وپایانی و جمعیت اشرشیاکلی در ایلئوم بود. نتایج نشان داد که در دوره های پرورش در سرانه خوراک مصرفی در بین تیمار های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد($P< 0/05$). نتایج بدشت آمده نشان داد که در دوره آغازین اختلاف معنی داری درسرانه افزایش وزن بین تیمار های مختلف مشاهده نشد($P< 0/05$). اما در دوره رشد اختلاف معنی داری در افزایش وزن بدن در تیمار های مختلف مشاهده گردید($P< 0/05$). بطوری که بیشتری افزایش وزن مربوط به تیمار دارای پروبیوتیک و کمترین مربوط به تیمار شاهد بود. نتایج افزایش وزن در مرحله پایانی نشان داد که تیمار های دارای پروبیوتیک و پربیوتیک بطور معنی داری افزایش وزن بیشتری نسبت به سایر تیمار ها داشتند($P< 0/05$). ضریب تیدیل غذایی در مرحله آغازین تحت تاثیر تیمار های آزمایشی قرار نگرفت($0/05$

P<). اما در مراحل رشد و پایانی تیمار های دارای پروبیوتیک و پربیوتیک بطور معنی داری ضریب تبدیل غذایی کمتری نسبت به دبگر تیمار ها نشان دادند(P< 0/05). نتایج نشان داد که کمترین جمعیت اشرشیاکلی در ایلئوم جوجه های مشاهده شد که پروبیوتیک مصرف نموده بودند. از نتایج بدست آمده چنین می توان استنباط نمود که پروبیوتیک و پربیوتیک موجب بهبود عمکلرد در جوجه های گوشتی گردیدندولی اسید آلی و آنتی بیوتیک ویرجینیا مایسین نتوانستند در مقایسه با تیمار شاهد بهبودی در عملکرد ایجاد نمایند.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، پربیوتیک، اسید آلی، ویرجینیامایسین، جوجه گوشتی

Effect of dietary probiotic, prebiotic, organic acid, and antibiotic supplementation to diets on performance and ileal population of Ecoli in Broiler

Seyed Hamed Razavi, Mehdi Ghaderi Jouybari, Habib Aghdam Shahriar, Yahya Ebrahim Nejad, Saed Goli,

The specific aim of this study was to determine the effects of the supplementation of separate probiotic (Bioplus 2B), prebiotic (A-max), including organic acid combination (ultimate acid), and antibiotic (virjiniamycin) to broiler diets on performance and population of Ecoli in ileum of broiler chicks. In this study, 300 one-day old male broiler chicks were used and divided equally into 5 groups. When the control group was fed a diet without supplemented diet probiotic (0.05% Bioplus 2B), organic acid (0.05% ultimate acid), prebiotic (0.05% A-max) and antibiotic (0.15% virjiniamycin) were added to the diets of the experimental groups respectively. The experimental period was 42 days. The results obtained in the experiment showed that, there were no significant different in feed intake in starter (1 to14), grower (15 to 28) finisher (29 to 42), weight gain in starter and feed conversion ratio in starter (P>0.05).However weight gain in grower and finisher, feed conversion ratio in grower and finisher were affected significantly by treatments (P<0.05). The group receiving prebiotic supplemented in the basal diet was exhibited higher body weight gain, and better feed efficiency in grower and finisher respectively than the control and other groups (P<0.05). The group receiving probiotic, prebiotic, antibiotic and organic acid supplemented in the basal diet was exhibited lower Ecoli in their ileum than the control group (P<0.05). However lowest Ecoli population was in ileum of group that use probiotic. Our findings suggest that feed conversion and performance of broiler chicks can be increased by dietary prebiotic and probiotc as alternatives antibiotics.

Key words**:** Probiotic, Perebiotic, Organic acid, Antibiotic, Broiler chicken

شناسه: PH49

اثر پروبیوتیک و منبع فسفر بر مواد معدنی استخوان، گلبول های سفید و قرمزوهموگلوبین خون در جوجه های گوشتی

میثم کوپایی ملک[1] – مهدی قادری جویباری[1]– محمد رضا تقی زاده[2]

دانش آموختگان کارشناسی ارشد علوم دامی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد **Email:exir60@yahoo.com**

قائم شهر 2– گروه علوم دامی دانشگاه هانس گوتینگن آلمان

باکتری های باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس لشنی فرمیس به دلیل تولید آنزیم فیتاز می توانند موجب افزایش آزاد سازی فسفر باند شده، از منابع آن گردند. در این آزمایش اثر این دو باکتری به عنوان پروبیوتیک به همراه منبع فسفر بر مواد معدنی استخوان، گلبول های سفید و قرمزو هموگلوبین خون در جوجه های گوشتی مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی وبه صورت آزمایش فاکتوریل4×2شامل دو سطح فسفر(غیر فیتاته وکل) وچهارسطح پروبیوتیک(الف: عدم استفاده ب:استفاده در مراحل آغازین، رشد، پایانی ج:استفاده در مراحل رشد، پایانی د:استفاده در مرحله پایانی) با8 تیمار و5 تکرار و10 قطعه در هر تکرار و درمجموع 400 قطعه جوجه گوشتی از سویه تجاری کاپ انجام گردید. نتایج نشان داد که پروبیوتیک موجب افزایش خاکستر خشک و فسفر استخوان گردید($P<0.05$). اثر فسفر بر خاکستر استخوان و پارامتر های خونی معنی دار نبود ولی بر فسفر استخوان اثر معنی داری داشت. اثر متقابل فسفر و باکتری ها اختلاف معنی داری در خاکسر و فسفر استخوان تیمار ها ایجاد نمود($P<0.05$). نتایج نشان داد که پروبیوتیک اختلاف معنی داری در گلبول سفید تیمار ها ایجاد نمود($P<0.05$). در مورد فاکتورهای گلبول قرمز و هموگلوبین اختلاف معنی داری بین تیمار ها مشاهده نگردید($P<0.05$).

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، منبع فسفر، مواد معدنی استخوان، گلبول قرمز و جوجه گوشتی

The effect of probiotic and phosphate source on bone minerals, white and red blood cell and hemoglobin in Broiler Chicks

The aim of this study was investigation on the effects of probiotic (basillus subtiliss and basillus lechniformiss) 2 phosphate source on bone minerals, white and red blood cell and hemoglobin in broiler chicks. In this experiment we used a 4×2 factorial arrangement of treatments with 4 Probiotic levels and 2 phosphate levels. There were 8 treatments, 5 replications, 10 chicks and totally 400 one-day old broilers from Cobb strain in 3 periods, starter (1-21d) grower (23-35 d) finisher (36-49 d). In 49 d blood samples collected from the bronchial vein. At the end of study one bird form each cage isolated for femur minerals analyzed. Femur mineral included ash and phosphate. Results obtained shown that probiotic had significant effect on bone minerals in entire of study and some periods (P<0/05). Probiotic significantly increased bone ash and phosphate (P<0/05). However, phosphate source didn’t have significant effect on all determined parameters. Interaction between probiotic and phosphate source on bone minerals were significant (P<0/05).Probiotic significant increased white blood cell (P>0.05). Neither probiotic and phosphate source nor interaction between them hadn't significant effect on red blood cell and hemoglobin (P>0.05). These results strongly suggest that probiotic may improve mineralization in bone. However, more studies are needed to support this hypothesis.

Key words**:** Probiotic, Phosphate source, Bone minerals, Red blood cell and Broiler

شناسه: PH50

بررسی مقایسه‌ای تاثیر عصاره مخمر و پروبیوتیک مخمری *Saccharomyces cervisiae* بر فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی کپور معمولی *Cyprinus carpio*

قاسم پور دهاقانی، پگاه[1] ** . محسنی، ماریا [1] . ضیایی نژاد، سعید [2]. پورفرهادی، مسعود [1]

دانشکده منابع طبیعی بهبهان – دانشگاه شهید چمران اهواز paqua6940@gmail.com *

عضو هیئت علمی دانشکده منابع طبیعی بهبهان – دانشگاه شهید چمران اهواز

پروبیوتیکها از بیوتکنولوژی های نوین آبزی پروری اند که برخی از آنها عمدتاً به دلیل چسبندگی خوب به سلول های روده و جلوگیری از گسترش باکتریهای بیماریزا و سم ساز، از طریق توازن فلور باکتریایی روده، سبب بهبود سلامت میزبان می شوند. این مطالعه به منظور بررسی و مقایسه تاثیر پروبیوتیک مخمری *Saccharomyces* cervisiae و عصاره مخمر بر فلور باکتریایی دستگاه گوارش کپور معمولی صورت پذیرفت. این آزمایش در قالب 4 تیمار شامل تیمار حاوی پروبیوتیک مخمری 0/1 ٪ (P) ، تیمار حاوی عصاره مخمر 0/1 ٪ (YE) ، تیمار حاوی مخلوط عصاره و پروبیوتیک مخمری هر کدام به میزان 0/1 ٪ (PYE) و تیمار شاهد (C) ، در تغذیه بچه ماهیان کپور معمولی *Cyprinus carpio* با میانگین وزن اولیه 37 گرم انجام شد. محتویات دستگاه گوارش ماهیان به ترتیب روی محیط کشت های MRS Agar و Nutrient Agar ، کشت داده شدند. تعداد کل باکتری های دستگاه گوارش، در تیمار حاوی پروبیوتیک (P)، به میزان قابل توجهی بالاتر از تیمار های حاوی عصاره مخمر(YE) و مخلوط عصاره و پروبیوتیک مخمری(PYE) مشاهده شد($p<0.05$). در تیمار شاهد نیز، تعداد کل باکتری های دستگاه گوارش، به میزان قابل توجهی بیشتر از تیمارهای حاوی عصاره مخمر و مخلوط عصاره و پروبیوتیک مخمری بود، ولی از تعداد کل باکتری های تیمار حاوی پروبیوتیک بالاتر نبود ($p>0.05$). تعداد لاکتوباسیل های دستگاه

گوارش، در تیمار حاوی پروبیوتیک به طور معنی داری بیشتر از گروه شاهد بود ($p<0.05$). نتایج کلی بدست آمده از این مطالعه نشان داد که افزودن پروبیوتیک مخمری بیش از سایر تیمارها در افزایش فلور لاکتوباسیلهای دستگاه گوارش که از باکتریهای مفید روده ایی هستند موثر بوده است.

کلمات کلیدی : پروبیوتیک مخمری *Saccharomyces cervisiae* ، عصاره مخمر، فلور باکتریایی روده ، لاکتوباسیلوس، کپور معمولی

شناسه: PH51

مقایسه تاثیر عصاره مخمر و پروبیوتیک مخمری*Saccharomyces cervisiae* بر رشد و بازماندگی کپور معمولی *Cyprinus carpio*

محسنی، ماریا[1] **. قاسم پور دهاقانی، پگاه[1]. ضیایی نژاد، سعید[2]. پورفرهادی، مسعود[1]

دانشکده منابع طبیعی بهبهان – دانشگاه شهید چمران اهواز

عضو هیئت علمی دانشکده منابع طبیعی بهبهان – دانشگاه شهید چمران اهواز:

استفاده از فن آوری های جدید در افزایش کارایی صنعت آبزی پروری ، نقش به سزایی داشته است، که از جمله آنها می توان به پروبیوتیک ها اشاره کرد. پروبیوتیک ها مکمل های میکروبی غذایی هستند که به طور سودمندی بر میزبان تاثیر می گذارند . در مطالعه حاضر، تاثیر عصاره مخمر و پروبیوتیک مخمری *Saccharomyces cervisiae* بر رشد و بازماندگی کپور معمولی در قالب 4 تیمار تغذیه ای شامل تیمار حاوی پروبیوتیک مخمری 0/1 ٪ (P)، تیمار حاوی عصاره مخمر 0/1 ٪ (YE) ، تیمار حاوی مخلوط عصاره و پروبیوتیک مخمری هر کدام به میزان 0/1 ٪ (PYE) و تیمار شاهد (C) ، مورد بررسی قرار گرفت . بنابر نتایج بدست آمده، ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی عصاره مخمر بیشترین میزان ضریب رشد ویژه (SGR) با 0/66٪ و بیشترین میانگین وزن نهایی (47/34 گرم) را نسبت به سایر تیمارها نشان دادند ($p<0.05$). تیمارهای پروبیوتیک(P) و عصاره مخمر(YE) به ترتیب با اندازه 14/82 و 14/55سانتی متر، میانگین طول بیشتری را نسبت به تیمار مخلوط عصاره و پروبیوتیک مخمری(PYE) با میانگین طول 13/95 نشان دادند، ولی در سطح $p<0.05$ اختلاف معنی داری با تیمار شاهد با 14/32 سانتی متر، وجود نداشت. بررسی درصد بازماندگی ماهیان تغذیه شده با جیره های مختلف، اختلاف

معنی داری را بین تیمارها نشان نداد ($p<0.05$). آزمایش نشان داد که عصاره مخمر نتایج به مراتب بهتری نسبت به پروبیوتیک مخمری بر روی پارامترهای رشد ماهی کپور معمولی داشته است.

کلمات کلیدی : پروبیوتیک مخمری*Saccharomyces cervisia* ، عصاره مخمر، رشد و بازماندگی، کپور معمولی

شناسه: PH52

اثرات استفاده از پروبیوتیک، اسید آلی و مخلوط چند گیاه دارویی بر صفات کیفی تخم مرغ و فراسنجه های بیوشیمیایی و ایمنی خون مرغ های تخم گذار

نوبخت*[1].، علی. سید پیران[2].، سید علی و پیش جنگ[1]، جعفر

[1] اعضاء هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغهnobakht20@Yahoo.com ، دانش آموخته ی کارشناسی ارشد علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه

این آزمایش جهت ارزیابی اثرات استفاده از پروبیوتیک، اسید آلی و مخلوط چند گیاه دارویی بر صفات کیفی تخم مرغ و فراسنجه های بیوشیمیایی و ایمنی خون مرغ های تخم گذار انجام گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با تعداد 192 قطعه مرغ تخم گذار سویه ی های- لاین (W-36) از سن 37 تا 49 هفتگی در 4 تیمار و 4 تکرار و هر تکرار با 12 قطعه مرغ تخم گذار شامل تیمار شاهد (بدون استفاده از پروبیوتیک، اسید آلی و مخلوط چند گیاه دارویی)، تیمار 2) حاوی 0/005 درصد پروبیوتیک پروتکسین، تیمار 3) حاوی 0/2 درصد اسید پروپیونیک و تیمار 4 حاوی 2 درصد (0/5 درصد از هر گیاه) از مخلوط گیاهان دارویی (آویشن، گزنه، پونه و کاکوتی) به مدت 12 هفته انجام گردید. نتایج حاصله نشان داد که استفاده از پروبیوتیک، اسید آلی و مخلوط چند گیاه دارویی دارای اثرات معنی داری بر شاخص رنگ زرده تخم مرغ می باشد ($P<0/05$). بالاترین شاخص رنگ زرده (4/5) در گروه آزمایشی 4 با کاربرد مخلوط گیاهان دارویی (آویشن، گزنه، پونه و کاکوتی) حاصل گردید. جیره های مختلف آزمایشی اثرات معنی داری بر فراسنجه های بیوشیمیایی و ایمنی خون نداشتند.

واژه های کلیدی: عملکرد، پروتکسین، اسید آلی، گیاهان دارویی

The effects using probiotic, organic acid and mixtures of some medical plants on egg traits and biochemical and immunity parameters of laying hens

Nobakht*, Ali. Sayiedpiran, Sayiedali and Pishjangh, Jafar

This experiment was conducted to evaluate the effects using probiotic, organic acid and mixtures of some medical plants on egg traits and biochemical and immunity parameters of laying hens. One hundred and ninety two of Hy-Line (W-36) laying hens from 37 to 49 weeks were randomly assigned to 4 dietary treatments with 4 replicate and 12 hen in each replicate. The treatment included: 1) control group 2) using probiotic, 3) using organic acid and finally 4) using mixture of medical plants (, menta pulagum, peppermint and nettle). The results showed that there was significanty difference in egg color index between experimental groups (P>0.05). The The best yolk color index (4.5) was observed in 4 experimental group. Exprimental diets did not have any significantly difference in biochemical and immunity parameters.

Keywords: Laying hen, performance, egg quality, organic acid, medical plants

شناسه: PH53

تاثیر باکتری ***Bacillus subtilis*** جداسازی شده از ماهیان دریایی به عنوان پروبیوتیک بر شاخص های رشد و بازماندگی لارو ماهی شانک زرد باله ***Acanthopagrus latus***

سعید ضیایی نژاد[1] و غلامرضا رفیعی[2]**

مجتمع آموزش عالی بهبهان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، بهبهان، ایران (zbsaeed@yahoo.com)

دانشگاه تهران ، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، کرج، ایران:

پروبیوتیکها به عنوان مکملهای میکروبی غذایی که از طریق تعادل میکروبی دستگاه گوارش میزبان اثرات سودمندی دارند تعریف می شوند. استفاده از پروبیوتیکها در پرورش آبزیان به علت افزایش تقاضا برای فعالیتهای آبزی پروری همگام با محیط زیست در حال گسترش است. مطالعه حاضر اثرات باکتری ***Bacillus subtilis*** که از ماهیان دریایی جداسازی شده بود را بر شاخص های رشد و بازماندگی لارو ماهی شانک زرد باله ، ***Acanthopagrus latus*** ، از 15 تا 60 روزگی در سه تیمار مورد بررسی قرار داد. تیمارهای W3 و W6 که لاروها بطور مستقیم از طریق آب به ترتیب در معرض 10^3 cells/ml و 10^6 باکتری قرار گرفتند و تیمار شاهد که هیچگونه پروبیوتیکی دریافت ننمود. نتایج نشان داد که در هر دو تیمار پروبیوتیکی شاخص های رشد و بازماندگی در لاروهایی که در معرض این باکتری پروبیوتیکی بودند بطور معنی داری بهبود یافت ($P<0/05$). بطوریکه این لاروها که پروبیوتیک دریافت نموده بودند، افزایش معنی داری ($P<0/05$) از نظر بازماندگی (20–10 درصد بیشتر) ، وزن تر (4/0–3/0 گرم بیشتر) و طول کل (7–6 میلیمتر بیشتر) در مقایسه با تیمار

شاهد از خود نشان دادند. به نظر می رسد برای بهبود شرایط رشد و بازماندگی در ماهیان دریایی ، استفاده از پروبیوتیکها در مراحل لاروی آنها از اهمیت خاصی برخوردار است.

کلمات کلیدی: ***Bacillus subtilis***، پروبیوتیک ، شانک زرد باله، ***Acanthopagrus latus***

شناسه: PH54

بررسی توان تولید آنزیم فیتاز در باکتریهای دستگاه گوارش نشخوارکنندگان و طیور

متشرعی زینب سادات، یخچالی باقر، سلیمی حسن، علوی سید محمد**

******کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی کاربردی جهاد دانشگاهی واحد تهران 85zmotesharrei@yahoo.com

گروه میکروبیولوژی کاربردی جهاد دانشگاهی واحد تهران- پژوهشکده بیوتکنولوژی تهران- دانشگاه تهران

فیتات یا میواینوزیتول هگزا فسفات، شکل غالب فسفر در دانه‌های روغنی و حبوبات است، با این وجود، فیتات در حیوانات تک معده‌ای مانند طیور و ماهی‌ها، به علت فقدان و یا سطح پائین آنزیم‌های هیدرولیز کنندهٔ فیتات،کمتر متابولیزه می گردد. بنابراین به منظور بهبود مصرف فسفر در جیرهٔ غذایی و کاهش آلودگی محیط زیست، تجزیهٔ فیتات به کمک آنزیم فیتاز از اهمیت غذایی و محیط زیستی شایانی برخوردار است. فیتازها که هیدرولیز فیتات به فسفات و میواینوزیتول را کاتالیز می‌کنند، در ارتقای کیفیت غذایی جیره‌های غنی از فیتات، نقش مهمی دارند.

4 نمونه شکمبه گوسفند، 10 نمونه شکمبه گاو و 2 نمونه دستگاه گوارش مرغ به طور تازه تهیه گردید و به منظور جداسازی باکتری های مولد آنزیم فیتاز از دستگاه گوارش حیوانات، از محیط کشت انتخابی MRS آگار دارای فیتین استفاده گردید و غربالگری به 2 روش Pour Plate و Spread Plate انجام شد. بروز کلنی ها روزانه بررسی و از آن دسته از باکتری ها که مولد آنزیم فیتاز بودند و به سبب رشد و استفاده از منبع فسفات محیط یعنی فیتین، هالهٔ شفافی در اطراف کلنی ایجاد شده بود، با کشت مجدد بر روی محیط کشت تازه،

کشت خالص بدست آمد. به منظور بررسی اولیهٔ ایزوله های بدست آمده از لحاظ توانمندی در تولید آنزیم فیتاز خارج سلولی قوی، آزمون مقایسه ای تولید آنزیم فیتاز و در نتیجه ارزیابی قطر هالهٔ شفاف، انجام پذیرفت و آزمایشهای بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی اولیه برای شناسایی جدایه های منتخب صورت گرفت.

از میان 16 نمونهٔ حیوانی، تعداد 95 جدایه مولد آنزیم فیتاز در ابتدا بدست آمد که تعدادی نیز از لحاظ شکل ماکروسکوپی کلنی به یکدیگر شبیه بودند. نکتهٔ قابل توجه گرم مثبت بودن تمامی جدایه ها، می باشد. با توجه به منبعی که از آن جدایه ها بدست آمد و همچنین، توانمندی رشد بر روی محیط های افتراقی مختلف و شکل میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بررسی قطر هالهٔ شفاف اطراف کلنی، تعداد 8 جدایه انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفت. باتوجه به نتایج حاصل از شناسایی جدایه ها به نظر می رسد که باکتری‌ها متعلق به جنس *استرپتوکوکوس* (3 باکتری)، *انتروکوکوس*(2 باکتری)، *لاکتوباسیلوس* (2 باکتری) و *باسیلوس* (1 باکتری) می باشد. در میان این باکتریها، جدایهٔ بدست آمده از گاو، *استرپتوکوکوس*، قطر هالهٔ شفاف بزرگتری را بر روی محیط کشت ایجاد کرد.

یافتن ایزوله‌های بومی که توانایی خوبی در فراهم سازی فسفات از منابع آلی آن دارند، می تواند گامی موثر در کاهش قیمت خوراک دام و طیور، باروری خاک و حتی کاهش آلودگی محیط زیست باشد . بنابراین، انجام مطالعات تکمیلی در این زمینه ضروری به نظر میرسد.

کلمات کلیدی: آنزیم فیتاز–حیوانات تک معده ای–باکتریهای مولد فیتاز

Analysis of phytase production capability in ruminant and poultry's bacteria

Motesharrei zeinab sadat, yakhchali baqer, salimi hassan, alavi mohammad**

**Expert of applied microbiology lab . zmotesharrei@yahoo.com

Research group of applied microbiology, Tehran biotechnology institute, Tehran university

Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) is the predominant form of phosphorus in plants . However, Phytate is not metabolized by monogastric animals, since they have no or very low levels of phytate hydrolyzing enzymes in their digestive tracts. In order to increase the bioavailability of essential dietary minerals and decrease environmental pollution, the degradation of phytate by phytase in foods and feeds is of nutritional and environmental importance. Phytase which catalyzes the hydrolysis of phytate to inorganic phosphate and less-phosphorylated myo-inositol derivatives are considered to be enzymes of great value in enhancing the nutritional quality of phytate-rich foods and feeds.

10 samples of bovine GI, 4 of sheep GI and 2 of hen GI prepared and phytase producing bacteria screened by spread or pour plate technique using MRS medium supplemented by phytine as the only phosphorous source. Bacteria capable to produce phytase can grow and make clearance zone around the colony. Based on the diameter of clearance zone, bacteria selected for further investigations. Microbiological and biochemical tests done for their initial identification.

95 isolates gained from 16 samples, all of which were gram positive. According to the initial source for screening and the diameter of clearance zone around grown colonies, 8 isolates were selected which belong to streptococcus(3), enterococcus(2), lactobacillus(2) and bacillus(1) genus.

Finding native isolates capable to improve bioavailability of P from its organic sources is an effective phase in reducing feedstuff cost, increasing soil fertilities and even reducing environmental pollution. In this regards, further investigations is needed.

Keywords :Phytase, monogastric animals, phytase producing bacteria

شناسه: PH55

بررسی تاثیر توده زیستی *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر باکتریهای اسید لاکتیک: مطالعه مروری

بهشتی پور حنانه* ، هاشمی مریم**

*دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
han_beheshti@yahoo.com

** دکترای بیوتکنولوژی استادیار دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی Hashemi348@yahoo.com

تهران،دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

جلبک اسپیرولینا و باکتریهای اسید لاکتیک که از نظر علوم تغذیه موجوداتی بسیار مفید و سرشار از ترکیبات ضروری برای بدن هستند کاربردهای وسیعی در درمان برخی بیماریها داشته و مصرف مرتب آن توصیه شده است. اما ترکیب این دو ماده حیاتی زنده آیا امکان پذیر بوده و منجر به کاهش یا افزایش خواص یکدیگر نمیگردد؟ این مقاله قصد دارد به این پرسش بپردازد.

تعیین تاثیر توده زیستی *اسپیرولینا پلاتنسیس* بر باکتریهای اسید لاکتیک

این مطالعه مروری بوده و از طریق جمع آوری آخرین یافته های پژوهشی مندرج در ژورنالهای معتبر مرتبط با موضوع انجام پذیرفته است. *اسپیرولینا* یکی از انواع جلبکهای میکروسکوپیک سبز- آبی است که متعلق به سیانوباکتریها می‌باشد.حاوی اسیدهای آمینه

گوناگونی است و پروتئینهای آن کیفیت بالایی دارد. شامل انواع ویتامینهای A ,B2 ,B6, B8 ,B12 ,E ,K و عناصری مانند کلسیم و آهن بوده و محتوای آنتی اکسیدانی بالایی دارد. همچنین حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع است. اثرات ضدویروسی، ضدتوموری و ضد التهابی داشته و باعث کاهش سطح چربی خون ، کاهش قند خون و کاهش وزن می‌شود، بهبود زخم را تسریع کرده و اثرات درمانی بسیار گسترده ای دارد. به همین دلیل به عنوان یک غذا- دارو شناخته می‌شود. این جلبک به دلیل ترکیبات سلولی خاص تاثیرات مثبتی بر پروبیوتیک ها دارد.

پروبیوتیک ها دسته ای از باکتری های اسید لاکتیک هستند که تعادلی بین میکروارگانیسم های مفید و مضر در دستگاه گوارش برقرار کرده ، خواص سلامت بخشی مانند پیشگیری از اسهال ، یبوست ، کمک به بازسازی مجدد فلور روده پس از تجویز آنتی بیوتیک ، بهبود عدم تحمل لاکتوز ، کاهش سطح کلسترول خون ، تحریک و تقویت سیستم ایمنی و دفاع در برابر سرطان داشته و به طور وسیعی در صنعت لبنیات به کار می روند.

قابلیت زنده مانی پروبیوتیک ها طی نگهداری از مهمترین چالش های تولید فرآورده های پروبیوتیکی می باشد. بقای سویه ها در محصولات به عوامل مختلفی از جمله pH ، نگهدارنده ها و مهارکننده های رشد بستگی دارد. بعضی از محصولات ناشی از متابولیسم باکتری های اسید لاکتیک آغازگر مثل دی استیل ، استالدهید و اسید لاکتیک باعث کاهش قابلیت زنده مانی بعضی از پروبیوتیک های افزوده شده به محیط می شوند.

مجاورت *اسپیرولینا* با پروبیوتیک ها به دلیل pH قلیایی ، ترکیبات موثره مانند آدنین ، هیپوگزانتین و اسید آمینه های آزاد وخواص پری بیوتیکی می تواند باعث تحریک رشد ، کنترل pH ، افزایش قابلیت زنده مانی و تولید اسید پروبیوتیک ها شود. هم جلبک و هم پروبیوتیک هر دو جزء غذاهای فراویژه هستند ، بنابراین مجاورت آنها با هم باعث افزایش دو چندان ارزش تغذیه ای و درمانی آنها می شود. مجاورت *اسپیرولینا* با پروبیوتیک ها اثر سینرژیست مثبت بر یکدیگر داشته و فراوانی ترکیبات زیستی مهم در این جلبک ها عامل اهمیت و نقطه قوت آن است. به همین دلیل توده های سیانوباکتریایی فرصت های جدیدی را در تولید محصولات لبنی فراویژه فراهم می کنند.

واژگان کلیدی: جلبکهای میکروسکوپی، *اسپیرولینا* ، باکتری های اسید لاکتیک

Effects of *Spirulina platensis* biomass on *Lactic acid bacteria:* a review article

Beheshti poor Hannane*, Hashemi Maryam**

*master student of food science and technology

han_beheshti@yahoo.com

**PhD of biotechnology, Assistant professor of food science and technology, Shahid Beheshti University

Hashemi348@yahoo.com

Spirulina and lactic acid bacteria which contains very useful and necessary material for the body are using in treating of some disease and their regular usage has been advised, but the question which is remained is; how do they work whenever they combine to gether. We are trying to answer to this question in this article.

To determine effects of Spirulina platensis biomass on Lactic acid bacteria

This is a review article base on the latest published finding in well known related journals.

spirulina is one of the blue green microalgaes which contains high antioxidant and belongs to cianobacteria groups and it contains multiple amino acids, high quality proteins, Fe and Ca ions, many vitamins such as A, B2, B6, B8, B12, E, K and unsaturated fatty acids. It has antiviral, anti-inflammatory and antitumural effects and it reduces blood lipid profile, blood sugar and body weight and reduces wound healing time, so because of wide range of its usage it is known as a therapeutical food.

Probiotics viability during storage is the most important challenges in the dairy industry. Viability of strains in the products depends on several factors such as pH, additives and growth inhibitors. Some products of the lactic acid starter metabolism such as diacetyl, acetaldehyde and lactic acid could be associated with the loss of viability of added probiotic bacteria.

Co-culture of *spirulina* and probiotics due to alkaline character, effective compounds such as adenine, hypoxantine and free amino acids and prebiotic properties, stimulates growth and increases viability and acid production of probiotics beside controls of pH.

Both of microalgae and probiotics are the functional foods, then co-culture of them increases nutritional and therapeutical value of them.

Co-culture of *spirulina* and probiotics such as lactic acid bacteria has synergistic effect on each other and excess of biologic materials in these two are their advantage and because of this cyanobacteria are making new opportunity in producing dairy products.

Key words: microalgae, *spirulina*, lactic acid bacteria

شناسه: PH56

تاثیر افزودنیها به شیر بر رشد و زنده مانی باکتریهای استارتر ماست معمولی و پروبیوتیک در ماست طی دوره نگهداری سرد

اسکندری محمدهادی [1]، **باروتکوب عبدالامیر [2]**، **روشن ضمیر مهدی [2]**، **حنیف پور محمدامین [2]**، **قاسمخانی ایمان [2]**

1.دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز eskandari@shirazu.ac.ir ، 2. کارکنان شرکت شیر پاستوریزه پگاه فارس

1. ایران شیراز دانشگاه شیراز دانشکده کشاورزی بخش علوم و صنایع غذایی ، 2. ایران شیراز کیلومتر 32 جاده شیراز-تخت جمشید شرکت شیر پاستوریزه پگاه فارس

ماست و محصولات شبه ماست به عنوان بهترین حامل باکتریهای پروبیوتیک مورد استفاده قرار می گیرد. نظرسنجی های اخیر تحقیقات بازار نشان دهنده زنده مانی ضعیف این میکروارگانیزمها در ماستهای تجاری است . افزودن افزودنیها به شیر می تواند بر رشد و زنده مانی این باکتریها تاثیر بگذارد . در این مطالعه ، تاثیر افزودنیهای متنوع لبنیاتی و غیرلبنیاتی بر زنده مانی باکتریهای استارتر ماست معمولی و پروبیوتیک بررسی شده است . شیر پاستوریزه و هموژنیزه ابتدا تا 50 درجه سانتی گراد حرارت دیده و سپس توسط افزودنیهای متنوعی

غنی شده است (عصاره مخمر، تریپتون، شیر خشک، پودر آب پنیر، پروتئینهای آب پنیر تغلیظ شده، ساکارز، سیستئین و میزان 5 برابر استارتر) . گرمخانه گذاری در دمای 43 درجه سانتی گراد انجام و تخمیر در PH:4.5 به پایان رسید . شمارش کلی استرپتوکوکوس ترموفیلوس ،لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس ،لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریا حین تولید و نگهداری طی د.ره 33 روزه در دمای 43 درجه سانتی گراد پایش شد .افزودن افزودنیها در شیر الگوهای متفاوتی از کاهش یا افزایش PH یا اسیدیته قابل تیتر را طی این دوره نشان داد . زمان رسیدن PH به 4.5 به طور قابل توجهی با افزودن 2 گرم بر لیتر عصاره مخمر ، تریپتون ، شیرخشک و سیستئین به میزان 500 میلی گرم در لیتر کاهش یافت ولی زمان گرمخانه گذاری در ماست های مخلوط با 2 گرم در لیتر پودر آب پنیر و پروتئینهای آب پنیر تغلیظ شده افزایش یافت .زنده مانی لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس در ماست حاوی تریپتون ، شیر خشک ، پودر آب پنیر و پروتئینهای آب پنیر تغلیظ شده افزایش یافته است . افزودن 500 میلی گرم در لیتر سیستئین ، زنده مانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را تا 15 روز از نگهداری تقویت می نماید در حالی که زنده مانی این باکتری با افزودن سیستئین از روز 21 تا روز 33 نگهداری تحت تاثیر معکوس قرار می گیرد . استفاده از میزان 5 برابر استارتر به طور قابل ملاحظه و مشخصی میزان زنده مانی لاکتوباسیلوی اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریا از روز 15 نگهداری تا انتها افزایش می دهد .

Effect of milk supplementation on growth and viability of starter and probiotic bacteria in yogurt during refrigerated storage

Eskandar[1]**, M.H. ,., barootkoob,[2] A.A. Roshanzamir, [2]* M , Hanifpoor,[2] M.A.ghasemkhani,[2] I.,

1.Department of food science and technology , School of Agriculture , Shiraz university , Shiraz , Iran eskandar@shirazu.ac.ir

Yogurt or yogurt-like products have been used as the most popular vehicle for incorporation of probiotic bacteria . recent market surveys have revealed poor viability of these microorganisms in commercial yogurt preprations . milk supplementation can affect growth and viability of these bacteria.

In this study, the effect of various dairy and non-dairy ingredients on survival of starter and probiotic badteria has been assessed .

Pasteurized and homogenized milk was tempered to 50^{o}C and fortified with various supplements (yeast extract , tryptone , WP , WPC , sucrose , cysteine , five-fold starter culture) .

Incubation was carried out at 43^{o}C and fermentation was terminated at PH 4.5 .

Viable counts of S.thermophilus , L. delbruekii subsp. bulgaricus , L. acidophilus and Bifidobacteria were monitored during manufacture and storage period of 33 days at 4^{o}C .

Milk supplementation showed different patterns of decrease or increase in PH or titrable acidity during this period . the time taken to reach PH 4.5 decrease considerably on addition of 2 gr/litr yeast extract , tryptone , milk powder and 500 mg/litr cysteine , but the incubation time increased in yogurt mixes supplemented with 2 gr/litr whey protein or whey protein concentrate .

The viability of L. delbruekii subsp. bulgaricus was improved in yogurt supplemented with tryptone , milk powder ,WP and WPC . Addition of 500mg/litr of cysteine promoted the viability of L. acidophilus until day 15 of storage , while the viability of L. acidophilus was adversely affected on addition of cysteine from day 21 to day 33 of storage

Using five-fold of inoculums , significantly increased viability of L. acidophilus and Bifidobacteria from day 15 of storage until the end .

Key words : yogurt , probiotic , supplementation

شناسه: PH57

بررسی ماندگاری باکتری های پروبیوتیک ماست در استان خوزستان

شاکریان منصور * کثیری حاجی محمد ** موسوی سید حسین **

به ترتیب دانشجوی دکترای صنایع غذایی، کارشناس ارشد علوم دامی، دانشجوی ارشد صنایع غذایی

با توجه به اثبات خواص غذاهای پروبیوتیک برای سلامتی، در یک یا دو دهه اخیر مصرف اینگونه محصولات فزونی چشمگیری یافته است. پروبیوتیک ها را می توان باکتری های زنده غذایی دانست که اثرات مفیدی در میزبان خود بوسیله ی اصلاح تعادل باکتریایی در روده بوجود می آورند.

در این تحقیق از 10 بچ تولیدی ماست با استفاده از دو استارتر شامل استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و دو گونه باکتری پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریا **(B. animalis BB-12)** تعداد کلنی های پروبیوتیک در روز اول، هفته اول و تا پایان هفته چهارم مورد ارزیابی قرار گرفت.

موضوع ماندگاری این گونه باکتریها تا پایان مدت مصرف که طبق تعاریف نباید از 10^7 –10^6کلنی در پایان مدت انقضاء کمتر باشد، ما را بر آن داشت تا این تحقیق انجام گیرد.

شمارش تعداد باکتریها در این تحقیق طبق روش **Bile + MRS** انجام گرفت. داده ها براساس طرح آماری کاملاً تصادفی با 5 تیمار و براساس **ANOVA** مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفتند. نتایج آنالیز داده ها نشان داد که روند کاهشی با گذشت زمان در تعداد باکتری های پروبیوتیک وجود داشته و در پایان مدت انقضاء محصول (هفته چهارم) اُفت اینگونه باکتریها به اثبات رسیده و این کاهش از نظر آماری معنی دار می باشد **(P<0.05).**

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، ماندگاری، استارتر، لاکتوپاسیلوس، بفیدوباکتریا

Studying the permanence of Yoghurt probiotic bacteria in Khoozestan

Shakerian, M. P.H.D student of food industries *

Kasiri, H.M farm animal sciences, M.A. **

Mosavi, S.H. M.A student of food industries **

Regarding to proving of the probiotic foods properties for the health, these products consumption have considerably increased during present one or two decades. Probiotics can be known as living food bacteria which cause useful effects in their host through bacteria balance improvement in the intestine.

The bacterias number counting was conducted based on Bile + MRS method in this research. Data was analyzed based on randomized complete statistical plan and according to ANOVA.

In this research made 10 batch of yoghurt using two starter culture including Streptococcus thermophilus and lactobacilus Bulgaricus and two Probiotic bacteria species including Lactobacilus acidophilus and Biffido bacteria (B. animalis BB-12) was applied. The probiotic colonies number was evaluated at 1,7,14,21,28 days.

The permanence of these bacteria until end of shelf life which it shouldn't be less than 10^7 colony at the end of expire time according to the definitions encouraged us to conduct this investigation.

Data analysis results showed the probiotic bacteria have had decreasing process during the time and the bacteria loss has been proved at the end of product expire time (fourth week) and this decreasing is significant from statistical view (P<0.05).

Key words: Probiotic, Permanence, Starter, Lactobacillus, Biffido Bacteria.

شناسه: PH58

جداسازی و شناسایی اگزوپلی ساکاریدهای تولیدی توسط برخی

لاکتوباسیلوسهای بومی ایران

مریم ابراهیمی[**]، مریم خدابخش[*] ، انوشه شریفان، مریم هاشمی ebrahimi_mt@yahoo.com

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات،دانشگاه شهید بهشتی

پلیمرهایی که از حیوانات و گیاهان به دست می آیند در فرمولاسیون مواد غذایی نقش مهمی ایفا می کنند. در صنعت به منظور قابل استفاده نمودن این نوع پلیمرها ، می بایست پاره ای اصلاحات شیمیایی بر روی آنها انجام شود؛ به همین سبب استفاده از آنها از طرف سازمانهای مختلف محدود شده است؛ بنابراین، به تدریج اگزوپلی ساکاریدهای میکروبی جایگزین این پلیمرها شده اند. اگزوپلی ساکاریدها در آب حل شده و خواص ژله ای و قوام دهندگی ایجاد می کنند؛ همچنین در مواد غذایی به عنوان امولسیون کننده، پایدارکننده، سوسپانسیون ذرات، کنترل کریستالیزاسیون، تشکیل فیلم و انکپسوله کردن به کار می روند. برخی از این اگزوپلی ساکاریدها اثر سلامت بخشی بر انسان دارند؛ به عنوان مثال، کلسترول خون را کاهش می دهند، فعالیت ضد توموری دارند، تحریک کننده سیستم ایمنی هستند، همچنین به مدت طولانی در بخش دستگاه گوارشی باقی می مانند و اثر پری بیوتیکی دارند.در این مطالعه سعی شده است که سویه های لاکتوباسیلوس تولید کننده اگزوپلی ساکارید از محصولات لبنی تخمیری ایران جداسازی و شناسایی شود. به این منظور لاکتوباسیلوسها در محیط MRS broth کشت و تکثیر شدند و سپس با کشت خطی در محیط MRS agar از لاکتوباسیلها ،کلنی خالص تهیه شد و پس از رنگ آمیزی گرم و تهیه عکس میکروسکوپی سویه های دارای کلنی موکوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت . در نهایت اگزوپلی ساکاریدهایی باند شده به سلول و ترشح شده در محیط که توسط این لاکتوباسیلوسها تولید شده بود خالص سازی شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند. که در صنعت می توان از لاکتو باسیلهای تولید کننده اگزوپلی ساکارید به عنوان co culture استفاده کرد و از اگزوپلی ساکاریدهای خالص شده، برای بهبود خواص حسی و رئولوژیکی محصولات لبنی به استفاده کرد.

کلمات کلیدی: اگزوپلی ساکارید، لاکتوباسیلوس، محصولات لبنی تخمیری، پری بیوتیک.

Isolation and Characterization of Exopolysaccharides Produced

by Some Iranian Native lactobacillus

Maryam Ebrahimi[**], Maryam Khodabakhsh[*], Anoosheh Ssharifan, Maryam Hashemi Ebrahimi_mt@yahoo.com

IAU Tehran Central Branch, IAU Science & Research Branch, IAU Science & Research Branch,Shahid Beheshti University.

Polymers from plant, animal, and microbial origin play an important role in food formulations. For industrial practice, most are chemically modified. Their use is restricted and alternative biothickener are the microbial Exopolysaccharides (EPS). Exopolysaccharides dissolve or disperse in water to give thickening or gelling properties. Such food polymers are also used for secondary effects, which include emulsification, stabilization, and suspension of particulates, control of crystallization, inhibition of syneresis, encapsulation, and film formation. Some EPSs produced by LAB present potential health-beneficial properties, such as immune stimulation, anti-ulcer and cholesterol-lowering activities. The present study aimed at isolation and screening of EPS producing lactobacilli strains, characterizing EPS from selected cultures. In a preliminary screening for EPS-producing Lactobacillus Strains in MRS agar medium and after geram coloring and providing microscopic image, strains that consist colonies mucoide identified as lactobacilli species. Then EPS that released into the culture medium (EPS-r) and the cell-bound EPS fraction (EPS-b) were identified. These strains can be use as co culture with predictable characteristics and contribute to the improvement of rheological and Sensory properties

Keywords: Exopolysaccharides, EPS, lactobacillus, periodic, fermented product

شناسه:PH59

بیوسنتز نانوذرات نیتانیوم بوسیله لاکتوباسیل های بومی ایران

دکتر مریم تاج آبادی ابراهیمی[1] ، سید امیر بهتاش لادن[2]، عباس محمدی ازهر[3]*

1–عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی (ebrahimi_mt@yahooo.com)

2– دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی(amir_behtsh@yahooo.com)

3– دانشجوی کارشناسی سلولی و مولکولی(am_azhar2@yahooo.com)

دانشگاه آزاد اسلامی پرند – آزمایشگاه میکروبیولوژی

استفاده از مواد نانوساختار بیش از پیش در حال گسترش است و دستیابی به نانو مواد ، ابتدایی ترین اقدام در توسعه فناوری نانو است. بخوبی مشخص شده است که سیتمهای زیستی قادرند شماری از ذرات فلزی یا ذرات آلی شامل فلزات با ابعاد نانومتری سنتز نمایند. . به عنوان مثال باکتری های مگنتوتاکتیک (**magnetotactic bacteria**) که مگنتیت (**Fe3O4**) یا گرگیت (**Fe3S4**) و دیاتوم ها ، که مواد سیلیسی تولید می کنند.

نمونه ها، سویه های باکتریایی می باشند که توسط خانم دکتر مریم تاج آبادی ابراهیمی از محصولات لبنی ایران ، جدا و نگهداری شده اند. هرسویه در 2 لوله جدا گانه ، در دمای 37^0C و درون انکوباتور CO_2 دار کشت داده شد. لوله اول محیط کشت همراه با **TiO2** و لوله دوم بدون **TiO2** بود. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتری در زمان های0 ،24 ، 48 ،72 و 120ساعت بعد از انکوبه کردن سویه ها ، طول موج های مختلف از**350nm – 900 nm** با مقیاس 50 به نمونه تابانده و میزان جذب ،اندازه گیری و نمودار آن رسم شد. همانطور که از نمودار جذب سویه **C6M2** در حالت های مختلف (72ساعت پس از کشت و در حضور و عدم حضور **TiO2**) و نمودار جذب **TiO2** بر می آید تفاوت در نمودار بدلیل وجود ماده ای متفاوت از باکتری و **TiO2** است . فرض بر این است تغییر حاصل شده در نمودار جذب ، بدلیل حضور نانوذرات تیتانیوم می باشد.

شناسه: PH60

ارزیابی ماست آویشن به عنوان حامل باکتری پروبیوتیکی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم

مرحمتی زاده محمد حسین[1]، عباسی محمد علی[2]، رضازاده سارا[3]**

1- استاد یار و عضو هیات علمی گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.
Email: Dr_mhmz@yahoo.com

2- دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون ، ایران.

3- دانش آموخته مهندسی صنایع غذایی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.

استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی از جمله گیاهان داروئی و ادویه جات در نگهداری از مواد غذایی از رشد چشمگیری برخوردار است این ترکیبات علاوه بر خواص ضد میکروبی، دارای خواص طعم دهندگی و آنتی اکسیدانی می باشند. از سوی دیگر فرآورده های پروبیوتیک با کاهش خطر حملات قلبی و بهبود فلور مطلوب میکروبی مسیر دستگاه گوارش، تأثیر شگرفی برسلامت مصرف کنندگان دارد. این پژوهش به منظور ارزیابی اثر گیاه آویشن بر فعالیت باکتری های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به عنوان باکتریهای آغازگر ماست پروبیوتیک صورت گرفت. جهت تعیین تأثیر درزهای مختلف آویشن (0٪ ، 2٪ ، 6٪ ، 9٪) بر رشد باکتری های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مرحله اول (شیر) و در مرحله دوم (ماست) پروبیوتیکی 0/33 گرم از باکتری لیوفلیزه ی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به طور جداگانه به یک لیتر شیر کم چرب استریلیزه افزوده گردید. در آزمایشی دیگر مخلوطی از دو باکتری به میزان 0/165 گرم از هر دو باکتری طبق مراحل بالا مورد آزمایش قرار گرفت.

نمونه ها براساس PH، اسیدیته و شمارش میکروبی در دوران گرمخانه گذاری و ماندگاری مورد بررسی قرار گرفتند در روز دهم تولید محصولات مورد ارزیابی حسی قرار گرفت. نتایج پرسش نامه در آزمون آماری توصیفی و با استفاده از نرم افزار Spss مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی بر آن بود که در نمونه های حاوی دو باکتری بهترین نتایج از نظر طعم، ماندگاری و رنگ را داشتند. قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیکی به روش شمارش مستقیم مورد شمارش قرار گرفت. در طی دوره 15 روزه تعداد باکتری ها کاهش یافته و همچنین میان نمونه شاهد و نمونه های حاوی غلظت های مختلف از آویشن اختلاف معنی داری مشاهده نگردید.

واژه های کلیدی : پروبیوتیک، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، شیر، آویشن.

Study of thymus yoghurt as the carrier of bacteria probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*

Marhanatizadeh mohammad hossein[1], abbasi mohammad ali[2], rezazadeh sara[3]**

1-Assistance Professor Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

Email: Dr_mhmz@yahoo.com

2- Under graduated Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

3- Under graduated of Food Sciences, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

The use of natural antimicrobial compounds indenting herbal medicine and flavorings in preserving foods has been widely devoted. These compounds other than antimicrobial characters ties have antioxidant and flavoring characteristics. On the other hand probiotic products by reducing the risk of heart attacks and recovering favorable microbial flora of digestive tract, have an extraordinary effect on consumers' health status. This survey was done in order to evaluate the effect of thymus on lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum as the starter bacteria of probiotic yoghurt.

Todetermine the effect of thymus different doses (0%, 3%, 6% and 9%) on the growth of probiotic bacteria, Bifidobacterium bifidum and lactobacillus acidophilus in the first stage (milk) and the second stage(proliotic yoghurt), 0.33 grams of lyophilized Bifidobacterium bifidum and lactobacillus acidophilus separately was added to one liter of sterilized low fat milk. In on other experiment, a mixture of two bacteria, in an amount of 0.165, was done according to the above steps. He samples were evaluated on the basis of PH, acidity and microbial count in the warm holding and preservation periods. In the tenth day of production the products were evaluated under organoleptic tests. The results of questionnaires were and used in thee descriptive analytic test and by the use of SPSS software. The results showed that in th e samples containing two bacteria we have got the best results related to the taste, preservation and color. Bioavailability of probiotie bacteria was counted by the use of direct counting method. In a 15- day period, the number of bacteria was decreased and also no statistically meaningful difference was observed between the control samples and the samples containing different concentrations of thymus.

Key words: probiotic, Bifidobacteriu m bifidum, Lactobacillus acidophilus, milk, thymus.

شناسه:PH61

بررسی رشد میکروب های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در شیر سویا

رضازاده سارا[1]، مرحمتی زاده محمد حسین[2]، نظافت کازرونی زینب[1]، جعفری ابراهیم[3]کاظمینی فاطمه[4]**

1- دانش آموخته مهندسی صنایع غذایی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.
S_rezazade20@yahoo.com

2- استاد یار و عضو هیات علمی گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران .

3- دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون ، ایران.

4- دانشجوی زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.

جهت بررسی رشد باکتری های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم در شیر سویا، به شکل جدا گانه و مخلوط در تهیه شیر سویای پروبیوتیکی این تحقیق انجام شد. در مرحله اول از شیر سویای ساده استفاده شد و به نمونه اول شیر سویا، لاکتو باسیلوس اسیدو فیلوس، به نمونه دوم بیفیدو باکتریوم بیفیدوم و به نمونه سوم لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم به صورت همزمان به عنوان استارتر افزوده شد. تغییرات حاصله در شیر سویای تلقیحی از نظر شاخص های اسیدیته و قابلیت زیستی باکتری های پروبیوتیکی در فرجه های زمانی به ترتیب دو ساعته و سه روزه در گرمخانه ثبت گردید. در ادامه این پژوهش از شیر سویای طعم دار (طعم طالبی) با اسیدیته و میزان باکتری کمتر در هر لیتر در نظر گرفته شد. مشاهدات حاکی از آن بود که شیر سویای ساده حاوی لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و پس از آن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس – بیفیدو باکتریوم بیفیدوم زود تر از بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به اسیدیته 42 درجه دورنیک رسید و شیر سویای حاصل از آن ها با مزه تندی مواجه شد. اما محصول تولیدی از بیفیدو باکتریوم بیفیدوم مزه بهتری نسبت به دو محصول دیگر داشت. در کل شیر سویاهای تولیدی از نظر طعم مورد قبول واقع نشد. محصولات تولیدی از شیر سویای طعم دار (طالبی) مزه بهتری نسبت به شیر سویای ساده داشت و مورد قبول واقع شد.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، شیر سویا، لاکتو باسیلوس اسیدو فیلوس، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم.

Determinezation of soy milk as carrier of probiotic microbe *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*

Rezazade sara[1], Marhamatizade mohammad hossein[2], Nezafat kazerooni zeinab[1], Jafari ebrahim[3], kazemeyni fateme[4]

1- Under graduated of Food Sciences, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.
S_rezazade20@yahoo.com

2-Assistance Professor Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

3- Under graduated Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

4- Under graduated Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

This research was done to study ***Lactobacillus acidophilus*** and ***Bifidobacteriuom bifidum*** in soy milk and soy milk had been produced separately and in combination. In the first stage, we used sample soy milk, and for the this, we used Lactobacillus ***acidophilus***. To the second sample of soy milk, ***Bifidobacterium bifidum*** and to the third sample at the same time ***Lactobacillus acidophilus*** and Bifidobacterium ***bifidum*** as the starter added to the salmples. Resulted changes in injected soy milk were registered considering acidity indexes and biological ability of probiotic bacteria in 2-hour and 3-day time interval respectively in incubation. ***Lactobacillus acidophilus*** reach 42 degree of dormice sooner than ***Lactobacillus acidophilus*** - ***Bifidobacterium bifidum*** and the resulted soy milk was rancidity. Then we used The flavored soy milk (with melon flavor) with lower pH indices used for one liter .This study showed that soy milk with ***Lactobacilus***

acidophilus and then sample whit ***Lactobacillus acidophilus*** - ***Bifidobacterium bifidum*** need the less time for reach to 42 degree Dournic acidity of sample with ***Bifidobacterium biphidium*** and the produced soy milk with ***Bifidobacterium biphidium*** has better flavor than another one. The productions had not suitable flavor. And the production whit flavored soy milk (with melon flavor) was better than simple soy milk in flavor.

Key words: Probiotic, Soy milk, *Lactobacillus acidophilus*, *Biphidobacterium biphidum*.

شناسه: PH62

بررسی تولید فرآورده لبنی پروبیوتیکی لورک با استفاده از باکتری لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم

کاظمینی فاطمه[1]، مرحمتی زاده محمد حسین[2] ،رضازاده سارا[3] ، عندلیبی نجمه[1]، غلامی پریا[1]**

1- دانشجوی زیست شناسی سلولی مولکولی گرایش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.fateme_kazemeyni@yahoo.com

2- استاد یار و عضو هیات علمی گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.

3- دانش آموخته مهندسی صنایع غذایی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران.

باکتری های پروبیوتیک پاتوژن های خطرناک روده ای را مهارمی کنند و در پیشگیری و درمان انواع اسهال بکارمی روند، قدرت ضد سرطانی و کاهش کلسترول خون را دارند و همچنین لورک نیز در درمان اسهال کودکان و اسهال مسافرتی بسیار موثر می باشد. از صدها سال پیش میکروب ها جهت تخمیر غذا و الکل بکارمی رفته اند. در این تحقیق میکروب لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را در فرآورده لبنی (لورک) کشت داده و برای رشد میکروب نمونه را در گرمخانه 38 درجه سانتی گراد قرار داده و پس از گذشت 5 ساعت که به اسیدیته مورد نظر رسید، نمونه به یخچال انتقال داده شد و 24 ساعت بعد فرآورده لبنی از نظر قابلیت زیستی باکتری پروبیوتیکی به روش Serial duration (شمارش مستقیم)مورد شمارش و کشت بر روی محیط MRS انجام گرفت. حرکت باکتری ها در زیر میکروسکوپ نشان دهنده زنده بودن میکروب های پروبیوتیکی بود و میزان آن در واحد گرم 10^{10} میکروب بود، باکتری های پروبیوتیکی برای اینکه خواص خود را در بدن فرد مصرف کننده مواد غذایی به وجود بیاورند باید به میزان حداقل 10^{7} در گرم و به صورت زنده وجود داشته باشند بطور کلی پروبیوتیک ها توانایی جایگزینی خوبی بجای آنتی بیوتیک ها دارند. این میکروارگانیسم ها بخوبی در فرآورده های شیری غنی از لاکتوز رشد می کنند. نمونه ها مورد ارزیابی حسی قرار گرفت، نتیجه حاکی از آن بود که نمونه ها از نظر طعم، عطر و مزه مورد قبول مصرف کننده قرار گرفت.

کلمات کلیدی: لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، لورک، شمارش میکروبی

Study of possible *Lactobacillus Acidophilus &Biphido bactrium biphidum* probiotic bacteria dairy production with Lorak

Kazemeyni fateme[1], marhamatizade mohammah hossein[2], rezazade sara[3], andalibi najme[1], gholami pariya[1]

1- Under graduated Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

2-Assistance Professor Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicing, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.

3- Under graduated of Food Sciences, Young Researchers Club, Islamic Azad University, Kazeroon Branch.
S_rezazade20@yahoo.com

Probiotic bacteria inhibit Dangerous pathogenic intestinal bacteria, are useful for prevention and treatment of diarrhea type's .Thy are anti-cancer and cholesterol reductive and Lorak is very effective for treatment of children diarrhea and traveler's diarrhea. Hundreds years ago, microbes was functional in food and alcohol fermentation. In this study, we have culture of *Lactobacillus Acidophilus* & *biphido bactrium biphidum* microbes in dairy products (Lorak) and incubate samples at 38 º C , after 5 hours when we have the desired acidity, the samples were transferred to the refrigerator and 24 hours

later ,dairy products was studied in biological feature of probiotic bacteria with Serial duration method (direct count) and MRS culture. Observation of bacteria activity with the microscope shows that Lactobacillus Bacillus Acidophilus and *biphido bactrium biphidum* microbes are alive and the amount of microbes in per gram is 10^{10} what. Probiotic bacteria should reach to 10^{7} at least and be alive until exist their properties in costumer people. In generally, probiotices are good to replace instead of antibiotics. These microorganisms grow in lactose-rich dairy products well. The samples were sensory evaluated.

Keywords: Lactobacillus Acidophilus, Biphidobactrum biphidum, Lorak, bacterial counts.

شناسه: PH63

مطالعه اثرات ساکارومایسز بولاردی بر میزان آنزیمهای کبدی تحت مواجه باسالمونلا تیفی موریوم در رت

مروتی شریف آباد مجید[1]، صالحی الهام[1]*، مهرنیا محمد امین[1]**

اعضاء هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر

چکیده:

سالمونلا تیفی موریوم یکی از سروتیپهای شایع جنس سالمونلا است که در انسان و حیوانات ایجاد عفونتهای مختلف می نماید. این ارگانیزم به خصوص در ابتدای زندگی حیوانات و انسان همیشه مسئله ساز بوده و خسارات زیادی را به بار می آورد از این رو انسان همواره در تلاش برای پیشگیری و درمان سالمونلوز در حیوانات بوده و راههای گوناگونی را امتحان کرده است ولی به دلایلی از نتایج آنها راضی نبوده است .با توجه به اینکه مصرف آنتی بیوتیکها نیز محدودیتهای خاص خود را دارا می باشد توجه او به استفاده از پروبیوتیکها جلب شده است. یکی از این مواد مخمر ساکارومایسز بولاردی است که در برخی کشورها به صورت تجاری وارد بازار شده است . به لحاظ اهمیت سالمونلاها تحقیقی پایه ریزی شد تا اثر این مخمر بر میزان ضایعات پاتولوژیک ناشی از عفونت تجربی با سالمونلا تیفی موریوم در رت به عنوان مدل تجربی در یک مطالعه آینده نگر مورد ارزیابی قرار گیرد. به این منظور تعدا 30 عدد رت نر خریداری شده به سه گروه A و B و C تقسیم شدند. قبل از القاء ساکارومایسز و باکتری، نمونه خون از رتها به منظور ارزیابی آنزیمهای کبدی ALTو AST اخذ گردید. رتهای گروه B وC هر کدام به ترتیب 1 سی سی محلول حاوی 10^7 و 10^8 مخمر ساکارومایسز، به مدت 5 روز به ترتیب به صورت دهانی دریافت نمودند. در حالیکه حیوانات گروه A فقط 1 سی سی سالین نرمال به عنوان گروه کنترل دریافت نمودند.به همه رتها در روز پنجم یک میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی حاوی 10^7 باکتری سالمونلا تیفی موریوم تجویز شد . در روز دهم بعد از تجویز باکتری مجددا از تمامی رتها نمونه سرم اخذ گردید و سپس به روش انسانی معدوم شدند . نمونه های سرم جهت اندازه گیری آنزیمهای ALT و AST به منظور ارزیابی عملکرد کبد مورد استفاده قرار گرفتند . در پایان ، نتایج حاصل از بررسی های سرمی گروههای مختلف با استفاده از آزمون آماری T- TEST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و حاکی از این بود که در گروه A یعنی گروه کنترل ، آنزیمهای ALT و AST به طور معناداری افزایش یافته بود(P< 0/001) . اما در گروههای آزمایش B و C چنین افزایشی مشاهده نگردید . که این خود موید اثرات محافظتی مخمر می باشد. همچنین اختلافات معنی داری در افزایش آنزیمهای ALT و AST بین گروههای B و C مشاهده نگردید که نشان می دهد 10^7 عدد مخمر با10^8 عدد مخمر در پیشگیری از ضایعات سالمونلا اختلاف چندانی ندارند .

واژه های کلیدی: کبد، آنزیمهای کبدی، ساکارومایسز بولاردی، سالمونلا تیفی موریوم

The study of effects of saccharomayces boulardii on liver enzyme level effected by salmenella typhimurium in rat

Morovati sharif abad,M.[1]Salehi,E.[1]*, Mehrnia,M.A.[1]**

1- Department of veterinary medicine, Islamic Azad University, shushtar branch, shushtar, Iran.

*. Dr.morovati@yahoo.com

Abstract:

Salmonellosis is an infectious disease of all animals species caused by a number of different species of salmonellae and manifested clinically by preacute septicemia or enteritis. many recent investigation suggested that some probiotics such as saccharomayces boulardii can inhibite multiplicate of enteropathogenic bacteria such as salmonella invitro and it is possible comprevent of pathological changes caused by this bacteria invivo.

This prospective study was conducted to investigate the protective effects of saccaromyces boulardii on the pathologic lesions of salmonella typhimurium in rat

Thirty Conventional male rats were divided in to three group (A,b,C).Blood samples were obtained for detection of ALT and AST normal values before administration of Saccharomyces boulardii and bacterium. .Rats in group B and C received 1 ml of saline contained 10^7 and 10^8 CFU of Saccharomyces boulardii orally for 5 days. Respectively animals in group A (as control) received only 1 ml saline as experiment groups.on day five all animales were challenged orally with 10^7 Salmonella typhimurium.on day 10 ,firstly all rats challenged with bacterium then blood sample were obtained and all animales were euthanised . In biochemical examination serum level of ALT and AST significantly incresed (p<0/001)in the control group(A) but didn't show any significant changes in the experiment group (B and C).also increased level of ALT and AST between group B and C were not significant.in other hand 10^7 and 10^8 S.B dosent have any significant difrentiation for protection of salmonelosis. The result of this study indiicate that sacharomyces boulardii hase protectiveeffect on salmonella typhimurium infection in rat and some serum biopchemical examination confirm this results.

Keywords:liver,ALT and AST, saccharomayces boulardii, salmonella typhimurium