مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۲، آذر ۱۳۹۲، ۷۴۶-۷۳۳

جداسازی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک از ماست‌های سنتی مناطق روستایی رفسنجان و بررسی اثرات ضد میکروبی آن‌ها- ۱۳۹۱

محمد فرح بخش[۱]، حمید حکیمی[۲]، رضا بهرام‌آبادی[۳]، محمدرضا ذوالفقاری[۴]، نادر درکی[۵]

دریافت مقاله: ۹۲/۲/۱۷ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۲/۷/۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۲/۷/۹ پذیرش مقاله: ۹۲/۸/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های پروبیوتیک از جمله مکلمل‌های غذایی هستند که اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارند. استفاده روزافزون از فرآورده‌های لبنی صنعتی به جای سنتی ممکن است منجر به افزایش احتمال حذف باکتری‌های پروبیوتیک شود. هدف از این مطالعه، جداسازی لاکتوباسیل‌ها از ماست‌های سنتی مناطق روستایی شهرستان رفسنجان و بررسی اثرات ضد باکتریایی آن‌ها بر علیه چهار باکتری بیماری‌زای شایع می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی که در سال ۱۳۹۱ انجام شد، ۴۰ نمونه ماست محلی از چهار منطقه روستایی تهیه و با استفاده از محیط کشت اختصاصی (MRS)، روش‌های غربالگری انتخابی، تست کاتالاز و تست‌های بیوشیمیایی مربوطه لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک جداسازی شدند. پس از جداسازی، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و چاهک، اثرات ضد باکتریایی این پروبیوتیک‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زای شایعی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولی، استرپتوکوک پیوژنز و پروتئوس ولگاریس* بررسی شد.

یافته‌ها: از ۴۰ نمونه ماست محلی، در مرحله اول ۳۳ سویه باکتری مقاوم به اسید جداسازی شد و در مراحل بعدی نهایتاً ۹ سویه با مقاومت زیاد به اسید و املاح صفراوی جداسازی شدند. این باکتری‌ها شامل: لاکتوباسیلوس‌های *کازئی* (در دو محل)، *رامنسوس، پلانتاروم، اسیدوفیلوس، بولگاریکوس، دلبروکی، فرمنتوم، و برویس* بود. همه سویه‌های پروبیوتیکی قادر به از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا شدند و بیشترین اثر ضد باکتریایی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: امکان وجود باکتری‌های پروبیوتیک با فعالیت ضد باکتریایی بر علیه بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا در ماست‌هایی که به صورت سنتی تهیه می‌شوند وجود دارند و می‌توان از آن‌ها در تولید فرآورده‌های لبنی صنعتی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: باکتری پروبیوتیک، ضد میکروبی، ماست‌های سنتی، *لاکتوباسیلوس*

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۲- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقاتی ایمونولوژی بیماری‌های عفونی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
تلفن: ۵۲۳۴۰۰۳-۰۳۹۱، دورنگار: ۵۲۲۵۲۰۹-۰۳۹۱، پست الکترونیکی: hamid.hakimi@gmail.com
۳- کارشناس میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۴- استادیار گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
۵- پزشک و دانشجوی دکترای سم‌شناسی، آزمایشگاه مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان کافی در بدن میزبان وجود داشته باشند تأثیر مثبت بر سلامت میزبان دارند [۱].

واژه «پروبیوتیک» از دهه ۱۹۶۰ میلادی مورد استفاده قرار گرفت و به معنای «برای حیات» می‌باشد. بخش قابل توجهی از باکتری‌ها به عنوان فلور میکروبی در روده زندگی می‌کنند که می‌توانند تأثیرات مثبت و یا منفی بر سلامت میزبان داشته باشند [۲]. پروبیوتیک‌های ایده‌آل ویژگی‌های متعددی دارند از جمله مقاومت نسبت به اسید معده، املاح صفراوی، آنزیم‌های گوارشی و مراحل فرآوری و تولید، قابلیت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده، غیربیماری‌زا و غیر تهاجمی بودن، توانایی حفظ و پایداری ژنتیکی، توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا. همچنین، آن‌ها جزئی از میکروفلوراها بوده، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارند، قابلیت کلونیزه شدن در دستگاه گوارش انسان را دارا می‌باشند و مانع اتصال باکتری‌های پاتوژن به مخاط روده می شوند [۷-۳].

پروبیونیک‌ها خطر اسهال مرتبط با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در کودکان را کم می‌کنند [۸]. این میکرواورگانیسم‌ها در محافظت نوزادان و شیرخواران در برابر بیماری‌هایی مانند سپسیس، التهاب و نکروز روده‌ای نقش دارند [۹]. همچنین، مطالعه‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد مصرف پروبیونیک‌ها بروز بیماری‌های تنفسی از جمله سرما خوردگی را کاهش می‌دهد [۱۰]. معمول‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک جزء باکتری‌ها و مخمرها محسوب می‌شوند. بعضی از این میکروارگانیسم‌ها سویه‌های انتخابی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* هستند گرچه سویه‌هایی از *انتروکوکوس*، *استرپتوکوکوس* و *اشرشیاکولی* نیز برای این منظور استفاده می‌شوند [۱۱].

سازوکارهای اصلی که پروبیوتیک‌ها منجر به ارتقاء سلامت میزبان می‌شوند مشخص نیست. به نظر می‌رسد سویه‌های خاصی از پروبیوتیک‌ها تأثیر مثبت بر سلامتی میزبان دارند و این تأثیر قابل تعمیم به سویه‌های دیگر نمی‌باشد. *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* از جمله پروبیوتیک‌های شایعی هستند که از طریق تولید اسید لاکتیک، اسید استیک و پروپیونیک اسید و کاهش pH روده از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده و منجر به حفظ تعادل در تعداد باکتری‌های فلور طبیعی روده می‌شوند [۱۲].

لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های دارای شکل باسیلی و کوکوباسیلی می‌باشند. این باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز، اکسیداز و ایندول منفی و قادر به احیاء نیترات نمی‌باشند و متعلق به خانواده *Lactobacillacea* می‌باشند و تقریباً ۵۶ گونه از این باکتری مورد شناسایی قرار گرفته است [۱۳]. این باکتری‌ها جزء فلور نرمال دهان، روده، و دستگاه تناسلی زنان می‌باشند و همچنین، در مواد لبنی، گوشت و سطح برگ گیاهان نیز یافت می‌شوند [۱۴].

سویه‌های *لاکتوباسیلوس* باعث تقویت سد مخاطی روده شده که این امر موجب حفظ و ارتقاء سطح ایمنی شده، میزان جابه‌جایی باکتری‌ها از طریق مخاط روده را کاهش داده و همچنین، در کاهش میزان بیماری‌های التهابی روده و سندرم روده تحریک‌پذیر نقش دارند [۱۵].

بیفیدوباکتریا باسیل‌های گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز، اکسیداز و ایندول منفی می‌باشند. متعلق به شاخه اکتینوباکتریا می‌باشند و محدوده رشد این باکتری‌ها ۴۵-۲۰ درجه سلسیوس است [۱۶].

در یک فرد سالم بین باکتری‌های مفید و مضر توازن وجود دارد، اما بسیاری از عوامل مثل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، اشعه درمانی، شیمی‌درمانی، استفاده از آب کلردار، توکسین‌های محیطی و عوامل ژنتیکی می‌توانند سبب از بین رفتن میکروب‌های مفید و غالب شدن میکروب‌های بیماری‌زا در بدن میزبان شوند [۲]. مواد غذایی که به صورت روزانه مصرف می‌شوند حاوی مقادیر متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در این میان سهم پروبیوتیک‌ها ممکن است ناچیز باشد. محصولات غذایی پروبیوتیک به دلیل داشتن ارزش تغذیه‌ای به موازات اثرات درمانی و سلامت بخش بیش از گذشته مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۷].

امروزه به دلیل استفاده روزافزون از مواد لبنی صنعتی امکان کاهش و یا حذف باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارد. با توجه به اهمیت پوبیوتیک‌ها در حفظ و ارتقاء سلامت انسان جداسازی و شناسایی آن‌ها در محصولات لبنی سنتی و به کارگیری آن‌ها در تولید انبوه فرآورده‌های لبنی ضروری به نظر می‌رسد. رفسنجان از جمله شهرهایی است که در روستاهای آن ماست همچنان به روش سنتی تهیه می‌شود. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل‌های موجود در ماست‌های محلی در چند روستای اطراف شهر و بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زایی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیاکولی*، *استرپتوکوکوس پیوژن*، و *پروتئوس ولگاریس* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری: در این مطالعه آزمایشگاهی، جهت جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از ماست‌های محلی، ۴ منطقه سرتخت، داوران، راویز و چنار در نظر گرفته شد (چون این مناطق بکر، روستایی و دور از شهر رفسنجان قرارگرفته‌اند). با تحقیقات به عمل آمده از این مناطق، نمونه‌برداری از محل‌هایی انجام شد که اطمینان کافی از عدم حضور سویه‌های تجارتی در این مناطق حاصل شد. نمونه‌گیری در ظروف کاملاً استریل و در شرایط استریل انجام گرفت. سپس، نمونه‌ها در مجاورت یخ قرار داده شد و در کمتر از ۱۰ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از ماست با استفاده از محیط کشت اختصاصی: محیط کشت جهت باکتری‌های پروبیوتیک [de Man, Rogosa and Sharpe (MRS)] است که محیطی اختصاصی برای رشد و جداسازی باکتری‌های مورد نظر محسوب می‌شود و قادر است نیازهای غذایی پیچیده آن‌ها را فراهم سازد. این محیط از شرکت Merck آلمان تهیه شد و طبق دستورالعمل این شرکت به صورت جامد (MRS agar) و مایع (MRS broth) تهیه شد. در مرحله بعد، ۲ گرم از هر نمونه را در مزور استریل ریخته و با محیط MRS broth به حجم ۱۰۰ سی‌سی (وزنی- حجمی) رسانده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2دار (co_2 ۱۰٪) گرم‌خانه‌گذاری صورت گرفت [۱۸].

غربال انتخابی سویه‌های مقاوم به اسید و املاح صفراوی: فرآورده‌های لبنی دارای تنوع میکروبی بسیار غنی بوده و جداسازی تک تک باکتری‌ها از این محصولات بسیار وقت‌گیر است، از این رو با اسیدی کردن محیط می‌توان تا حدود زیادی سویه‌های غیر پروبیوتیکی را حذف نمود. جهت انتخاب سویه‌های مقاوم به اسید، ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت در مرحله قبل را سانتریفیوژ (۱۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه) کرده و به میکروب‌های ته نشست شده ۲۰ میلی‌لیتر محلول بافر نمک فسفات اسیدی PBS (pH= ۲/۵) اضافه شد [۱۹].

پس از ۲ ساعت انکوباسیون در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور) و سلول‌ها از محلول جدا شد. سانتریفیوژ نمونه‌های بعد از مرحله تیمار اسیدی موجب می‌شود که باکتری‌ها حتی با تعداد کم در لایه‌های پایینی رسوب کرده و به همراه محیط مایع رویی از دست نرود [۲۰].

پس از دو بار شستشو و سانتریفیوژ رسوب با بافر نمک فسفات خنثی، سلول‌ها به محیط MRS agar منتقل و ۷۲ ساعت در حضور دی‌اکسیدکربن گرم‌خانه‌گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS agar پس از ۳ تا ۵ بار کشت خطی خالص شدند. سپس، نمونه‌های خالص شده از نظر واکنش گرم و تست کاتالاز بررسی شدند. ایزوله‌های میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی جنس لاکتوباسیلوس شناخته شدند. در طی مراحل خالص‌سازی، برای کاهش مخمرهای موجود در محیط از U/ml ۵۰ نیستاتین استفاده شد. نیستاتین با مهار رشد مخمرها امکان جداسازی بهتر و مؤثرتر لاکتوباسیل‌ها را فراهم می‌آورد [۲۱].

به منظور بررسی میزان تحمل اسید سویه‌های ایزوله شده، باکتری‌های جدا شده از مرحله قبل به محیط MRS broth تلقیح و در انکوباتور co_2دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. از هر محیط MRS broth ۱ سی‌سی به ۱۹ سی‌سی بافر نمک فسفات اسیدی PBS (pH=۲/۵) و ۱ سی‌سی به ۱۹ سی‌سی PBS (pH=۷) به عنوان شاهد تلقیح شد [۲۲]. پس از ۲ ساعت گرم خانه‌گذاری سریال رقت تهیه کردیم و با محیط کشت MRS agar به روش پورپلیت کشت صورت گرفت و تعیین جمعیت شدند. بر اساس جمعیت تعیین شده و بعد از تیمار اسیدی، ایزوله‌ها از نظر میزان درصد مقاومت به شرایط اسیدی مشخص شدند. تعیین درصد بقای ایزوله‌ها در محیط اسیدی با تعیین واحد تشکیل کولونی (Colony Forming Unit, CFU) برای هر سویه باکتری محاسبه شد.

جهت بررسی مقاومت به املاح صفراوی از oxgall که مخلوطی از cholic acid (نمک صفراوی نامحلول در آب) و taurocholic acid (نمک صفراوی محلول در آب) می‌باشد، استفاده شد.

سویه‌های ایزوله شده در این مرحله به محیط کشت MRS agar حاوی ۰/۳٪ نمک‌های صفراوی (Oxgall) و بدون نمک‌های صفراوی به صورت پورپلیت منتقل و کشت صورت گرفت. بر اساس جمعیت تعیین شده، درصد ایزوله‌های مقاوم به نمک‌های صفراوی (Oxgall) مشخص شدند.

ضمناً تعداد رقت‌ها و کشت‌ها برای هر نمونه با ۳ بار تکرار انجام شد. ایزوله‌های بررسی شده در ۴ گروه قرار گرفتند:

- مقاوم به اسید و مقاوم نمک‌های صفراوی (Oxgall)
- مقاوم به اسید و حساس به نمک‌های صفراوی (Oxgall)
- مقاوم به نمک‌های صفراوی (Oxgall) و حساس به اسید
- حساس به اسید و حساس به نمک‌های صفراوی (Oxgall)

شناسایی باکتری‌های خالص شده با تست‌های رایج مطرح شده در کتاب The Prokaryotes و بر اساس صفات شکلی و رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، اکسیداز، حرکت، تست‌های بیوشیمیایی مثل تخمیر قندهای مختلف از جمله گلوکز، مانوز، فروکتوز، تره‌هالوز، لاکتوز، آرابینوز،

ساکاروز، گزیلوز، گالاکتوز، توانایی رشد در دماهای مختلف و تولید NH3 از آرژنین انجام گرفت [۲۳].

در این تحقیق از سویه استاندارد *لاکتوباسیل اسیدوفیلوس* (1643)PTCC که از مرکز کلکسیون قارچها و باکتری‌های صنعتی سازمان پژوهش‌های علمی- صنعتی ایران تهیه شده بود به عنوان کنترل، مورد استفاده قرار گرفت. چهار سویه باکتریایی بیماری‌زا شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1431)، *E.coli* (PTCC 1552)، *استرپتوکوکوس پیوژنز* (PTCC 1447)، *پروتئوس ولگاریس* (PTCC 1079) پس از تهیه و کشت در محیط کشت مایع مغذی با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیکی: برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی باکتری‌های پروبیوتیکی جدا شده از ماست‌های محلی از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش‌های دیسک (Disk Diffusion) و چاهک (Well Diffusion Agar) برای تعیین مهارکنندگی باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده شد و اثر آنتاگونیستی باکتری‌های پروبیوتیکی بر ۴ سویه استاندارد بیماری‌زایی بررسی شد. شایان ذکر است، به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد.

تجزیه تحلیل آماری: تجزیه تحلیل آماری نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای آزمون اختلاف میانگین در چند گروه کیفی از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. برای افزایش میزان معنی‌داری از آزمون Post Hoc Tukey استفاده شد که نشان‌دهنده بیشترین معنی‌داری می‌باشد.

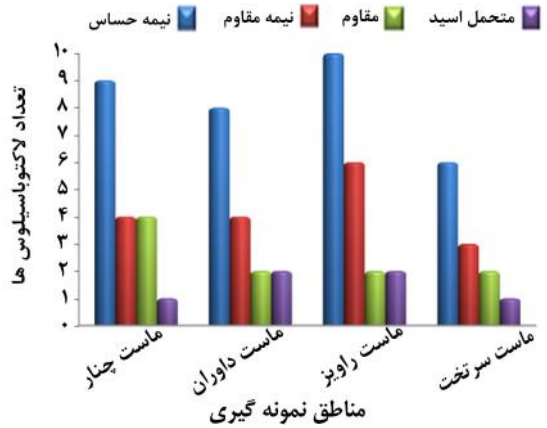
نتایج

۳۸ ایزوله باکتری اسید لاکتیک متحمل شرایط اسیدی از ۴۰ نمونه ماست محلی جداسازی شد. بیشترین ایزوله‌های متحمل اسید به ترتیب از مناطق راویز و چنار جدا شد. اما به نسبت سویه‌های کمتری از مناطق داوران و سرتخت به دست آمد. از میان ۳۸ سویه باکتری اسید لاکتیک جدا شده ۳۳ سویه جنس *لاکتوباسیلوس* تشخیص داده شد و برای آزمون‌های تکمیلی (بعدی) انتخاب شد. بررسی مقاومت به اسید روی ۳۳ ایزوله متحمل اسید انجام شد. تعداد ۱۷ ایزوله بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در شرایط اسیدی جمعیتی بیش از 10^7 نشان دادند. تعداد ۱۰ ایزوله نیز بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در شرایط اسیدی جمعیت 10^4 تا 10^7 نشان دادند. شش ایزوله دیگر جمعیتی کمتر از 10^4 نشان دادند (نمودار ۱). با توجه به موارد ذکر شده ایزوله‌ها بر اساس میزان مقاومت به اسید، در سه گروه قرار گرفتند:

۱.- ایزوله‌های با جمعیت بیش از 10^7 مقاوم

۲. ایزوله‌های با جمعیت 10^4 تا 10^7 نیمه مقاوم

۳. ایزوله‌های با جمعیت کم تر از 10^4 نیمه حساس



نمودار ۱ - مقایسه تعداد لاکتوباسیل‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس به اسید جدا شده از ماست‌های محلی رفسنجان

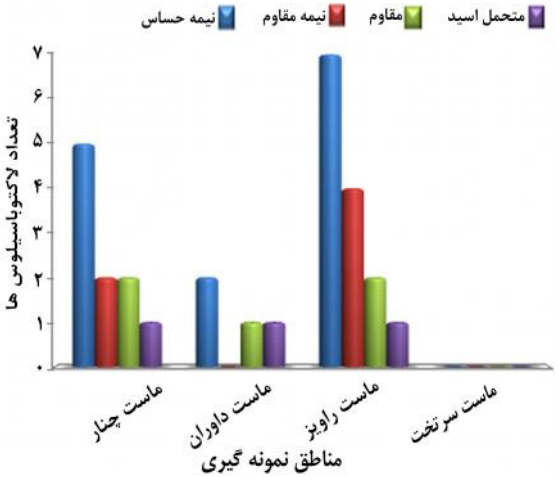
بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی روی ۱۴ ایزوله متحمل نمک‌های صفراوی انجام شد. تعداد ۶ ایزوله بعد از ۲ ساعت گرم خانه‌گذاری در شرایط نمک‌های صفراوی جمعیتی بیش از 10^7 نشان دادند. تعداد ۵ ایزوله نیز بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در شرایط نمک‌های صفراوی

جمعیت 10^4 تا 10^7 نشان دادند. سه ایزوله دیگر جمعیتی کمتر از 10^4 نشان دادند (نمودار۲). با توجه به موارد ذکر شده ایزوله‌ها بر اساس میزان مقاومت به نمک‌های صفراوی، در سه گروه قرار گرفتند:

۱. ایزوله‌های با جمعیت بیش از 10^7 مقاوم

۲. ایزوله‌های با جمعیت 10^4 تا 10^7 نیمه مقاوم

۳. ایزوله‌های با جمعیت کم تر از 10^4 نیمه حساس



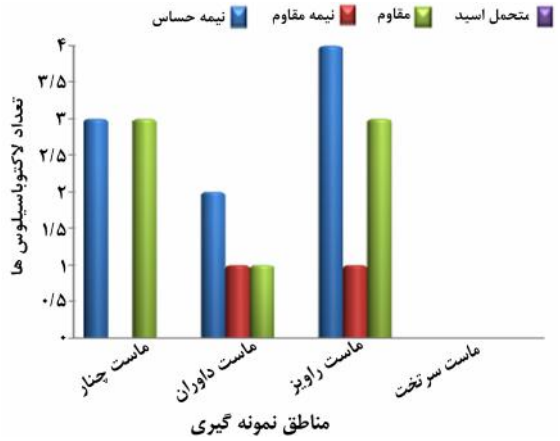
نمودار ۲- مقایسه تعداد لاکتوباسیل‌های مقاوم، نیمه مقاوم و حساس به نمک‌های صفراوی جدا شده از ماست‌های محلی رفسنجان

در مرحله بعد، بررسی مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی روی ۹ ایزوله متحمل اسید و نمک‌های صفراوی انجام شد. تعداد ۲ ایزوله بعد از ۲ ساعت گرم خانه‌گذاری در شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی جمعیتی بیش از 10^7 نشان دادند . تعداد ۷ ایزوله نیز بعد از ۲ ساعت گرم خانه‌گذاری در شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی جمعیت 10^4 تا 10^7 نشان دادند و هیچ ایزوله‌ای جمعیتی کمتر از 10^4 نشان نداد. با توجه به موارد ذکر شده، ایزوله‌ها بر اساس میزان مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی، در سه گروه قرار گرفتند (نمودار ۳):

۱. ایزوله‌های با جمعیت بیش از 10^7 مقاوم

۲. ایزوله‌های با جمعیت 10^4 تا 10^7 نیمه مقاوم

۳. ایزوله‌های با جمعیت کم تر از 10^4 نیمه حساس



نمودار ۳- مقایسه تعداد لاکتوباسیل‌های مقاوم، نیمه مقاوم و نیمه حساس به اسید و نمک‌های صفراوی جدا شده از ماست‌های محلی رفسنجان

در نهایت ۹ سویه مقاوم و نیمه مقاوم به اسید و نمک‌های صفراوی (پروبیوتیک) برای شناسایی بیوشیمیایی و بررسی اثر ضد میکروبی آن‌ها علیه باکتری‌های پاتوژن انتخاب شدند.

با توجه به نتایج به دست آمده نمونه ماست‌های منطقه راویز بیشترین درصد ایزوله مقاوم به اسید و مقاوم به املاح صفراوی را در بین مناطق دیگر مورد بررسی به خود اختصاص دادند و کمترین درصد را نمونه ماست‌های منطقه سرتخت به خود اختصاص دادند.

بعد از خالص‌سازی و جداسازی کلنی‌ها، برای شناسایی گونه‌های پروبیوتیکی از رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست حرکت، تست اکسیداز، تخمیر قند و تولید NH3 از آرژنین استفاده شد (جداول ۱ و ۲). ابتدا باسیل‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و فاقد حرکت شناسایی شدند و بعد از نتایج تخمیر قند، گونه آن‌ها طبق The Prokaryotes مورد تأیید قرار گرفتند [۲۳].

جدول۱- شناسایی سویه های پروبیوتیکی بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و مرفولوژیکی

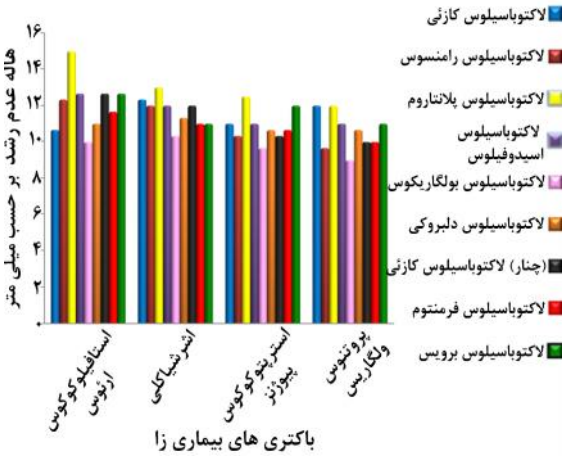
کد ایزوله	تخمیر کربوهیدرات‌ها									واکنش گرم	حرکت	NH_3 از آرژنین	کاتالاز	اکسیداز	رشد در دمای (درجه سلسیوس)	
	گلوکز	مانوز	فروکتوز	تره هالوز	لاکتوز	آرابینوز	ساکاروز	گریلوز	گالاکتوز						۴۵	۱۵
YD14	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+
YD16	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+
YR21	+	+	+	−	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−	+	−
YR25	+	+	+	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−
YR26	+	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	+	−	−	+	−
YR30	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	+
YC32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−
YC35	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	+	+
YC38	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	−	+
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC(1643)	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−

جدول۲- منبع سویه‌های لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک

شماره	کد ایزوله	گونه	محل جداسازی
۱	YD14	*Lactobacillus casei*	**داوران**
۲	YD16	*Lactobacillus rhamnosus*	**داوران**
۳	YR21	*Lactobacillus planetarium*	**راویز**
۴	YR25	*Lactobacillus acidophilus*	**راویز**
۵	YR26	*Lactobacillus bulgaricus*	**راویز**
۶	YR30	*Lactobacillus delbrueckii*	**راویز**
۷	YC32	*Lactobacillus casei*	**چنار**
۸	YC35	*Lactobacillus fermentum*	**چنار**
۹	YC38	*Lactobacillus brevis*	**چنار**

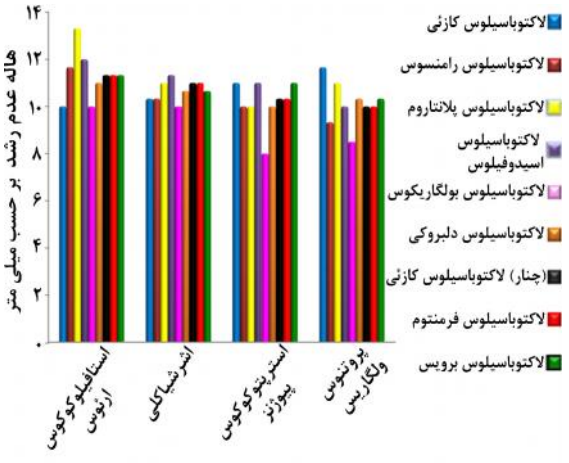
پس ازجداسازی و شناسایی سویه‌های پروبیوتیکی، فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت آن‌ها که از طریق سانتریفیوژ جداسازی شده بود بر علیه ۴ سویه بیماری‌زا به کمک روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت که اثر مثبتی در برداشت و تمام گونه‌ها توانستند باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند، توانایی مهارکنندگی آن‌ها از ۱۵-۸ میلی‌متر متغیر بود و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین توانایی را در مهار باکتری‌های بیماری‌زا از خود نشان داد.

نتایج حاصل از روش چاهک (Well Diffusion Agar): نتایج به دست آمده در این روش در نمودار ۴، نشان دهنده اثر مهاری مناسب این دسته از باکتری‌ها است. طی این روش، بیشترین اثر مهاری را *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر علیه *استافیلوکوکوس ارئوس* با مهار ۱۵ میلی‌متر از خود نشان داد و کمترین میزان مهارکنندگی نیز متعلق به *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* علیه *پروتئوس ولگاریس* با مهار ۹ میلی‌متر بود سایر باکتری‌ها نیز با میانگین مهاری ۱۲-۱۱ میلی‌متر توانایی بالایی در مهار عوامل بیماری‌زای باکتریایی از خود نشان دادند.



نمودار ۴- مقایسه توانایی گونه‌های پروبیوتیکی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا (روش چاهک)

نتایج حاصل از روش دیسک (Disk Diffusion): نتایج به دست آمده در این روش در نمودار ۵، نشان‌دهنده اثر مهاری این دسته از باکتری‌ها است. طی این روش، بیشترین اثر مهاری را *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* با مهار ۱۳/۳۳ میلی‌متر از خود نشان داد و کمترین میزان مهارکنندگی متعلق به *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* علیه *استرپتوکوکوس پیوژنز* با مهار ۸ میلی‌متر بود. سایر باکتری‌ها با میانگین مهاری ۱۱-۹ میلی‌متر توانایی بالایی در مهار عوامل بیماری‌زای باکتریایی از خود نشان دادند.



نمودار۵- مقایسه توانایی گونه‌های پروبیوتیکی در مهار باکتری‌های بیماری‌زا (روش دیسک)

بحث

در این تحقیق از ماست‌های سنتی تهیه شده در چهار منطقه روستایی شهرستان رفسنجان، باکتری‌های با پتانسیل پروبیوتیکی شناسایی و جداسازی گردید. مراحل اولیه شامل شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیکی با پتانسیل پروبیوتیکی بود. از شاخص‌های باکتری‌های پروبیوتیک، تحمل شرایط اسیدی و مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی است که با تعیین این ویژگی‌ها می‌توان اختلاف ایجاد شده در بین سویه‌های پروبیوتیک را بررسی نمود. همچنین، محدوده pH در بقاء باکتری‌های اسید لاکتیک اهمیت فراوانی دارد که از روش‌های متعددی می‌توان باکتری‌های مقاوم به اسید را جداسازی نمود که در این تحقیق از دو آزمایش (مقاومت اسیدی بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی) جهت تشخیص پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های ایزوله شده، استفاده شد. زیرا این دو ویژگی جزو مهم‌ترین خصوصیات باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شود که

مطابق با تحقیق Dunne و همکاران در سال ۲۰۰۱ این ارزیابی صورت گرفت [۲۴].

در این بررسی در مرحله نخست به منظور حذف انواع غیر متحمل اسید از روش غربال انتخابی در شرایط اسیدی استفاده شد. چون فرآورده‌های لبنی دارای تنوع میکروبی بسیار غنی بوده و جداسازی تک‌تک باکتری‌ها از این محصولات بسیار وقت‌گیر است، از این رو با اسیدی کردن محیط تا حدود زیادی سویه‌های غیر پروبیوتیکی حذف شدند. از سوی دیگر به منظور کاهش احتمال از دست دادن انواع متحمل به اسید در طی مراحل مختلف از سانتریفوژ و نیز افزودن نیستاتین به محیط استفاده شد.

در روش غربال انتخابی، تیمار اسیدی کردن محیط تا حدودی سویه‌های غیر پروبیوتیک را حذف کرد و امکان بررسی نمونه‌های بیشتری را فراهم می‌سازد، به طوری که از ۴۰ نمونه ماست محلی ۳۸ سویه *لاکتوباسیل* متحمل اسید جداسازی و از این تعداد ۹ سویه مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی انتخاب شدند.

جهت بررسی مقاومت به املاح صفراوی از Oxgall ۰/۳٪ استفاده شد، چون دستگاه گوارش انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳٪ وزنی/ حجمی‌است و برای غربال سویه‌های مقاوم به صفرا، کافی تلقی می‌شود [۲۵]. در مطالعه‌ای که در سال ۱۹۹۴ میلادی توسط Chateau و همکاران، انجام شد، تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد ۳۸ سویه لاکتوباسیلوس استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مورد آزمایش قرار دادند و سویه‌های مورد آزمایش را به آرامی تحت تأثیر نمک‌های صفراوی ۰/۳٪ قرار دادند و تأثیر قابل توجهی در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک‌های صفراوی مشاهده کردند. یافته‌های مطالعه حاضر در آزمایش سویه‌های انتخاب شده نسبت به نمک‌های صفراوی با یافته‌های موجود در مطالعه ایشان مطابقت داشت [۲۶].

شناسایی بیوشیمیایی این سویه‌ها نشان داد توانایی مقاومت و تحمل املاح صفراوی وابسته به گونه نیست و در بین سویه‌های یک گونه متفاوت است. دامنه وسیع میزان مقاومت به املاح صفراوی و گوناگونی در میزان مقاومت سویه‌های مختلف که در این پژوهش مشاهده شد با نتایجی که Goldin از بررسی لاکتوباسیل‌های جداشده از شیر تخمیری ساردینا به دست آورده است منطبق است. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات این پژوهشگر، سویه‌های جدا شده از فرآورده‌ای لبنی سنتی نسبت به پروبیوتیک تجاری Reuflor، Enterolactis مقاومت بیشتری دارند. این نتایج اهمیت، بررسی مقاومت در برابر شرایط اسیدی و املاح صفراوی، در انتخاب سویه‌های پروبیوتیک را تأیید می‌کند [۲۷].

باکتری‌های پروبیوتیکی با مکانیزم‌های مختلف از جمله کاهش pH، رقابت بر سر گیرنده‌های سلولی و تولید مواد ضد میکروبی نظیر باکتریوسین‌ها تولید اسیدهای لاکتیک و استیک، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالدئید و آمونیاک قادرند متابولیسم باکتری‌ها یا تولید سموم توسط آن‌ها را نیز تحت تأثیر قرار دهند و اثرات بازدارندگی روی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها داشته باشند. طی بررسی Boris و همکاران، لاکتوباسیلوس‌های جداشده از لبنیات مانع رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشیرشیاکلی*، *باسیلوس سابتلیس* شدند که بیشترین اثر مهارکنندگی روی استافیلوکوکوس اورئوس بود [۱۹]. در این مطالعه، لاکتوباسیلوس‌های جداشده از ماست توانستند در مقابل ۴ سویه بیماری‌زا اثر ممانعت‌کنندگی داشته باشند که در

این بین بیشترین اثر در مهار استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد.

در مطالعه‌ای که Heidari و همکاران انجام دادند، ۱۷ سویه باکتری اسید لاکتیک را از فرآورده‌های لبنی برای آزمایش فعالیت ضد میکروبی جداسازی و هاله عدم رشد باکتری‌های شناساگر که شامل ۱۰ سویه پاتوژن میکروبی در برابر محلول رویی لاکتوباسیلوس‌ها به روش چاهک بود، بررسی کردند. بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد روی *استافیلوکوکوس اورئوس* به اندازه ۲۰ میلی‌متر و کمترین قطر هاله عدم رشد روی انتروباکتر آئروژنز به اندازه ۱ میلی‌متر گزارش کردند [۲۸]. در مطالعه اخیر نیز بزرگترین قطر هاله عدم رشد روی *استافیلوکوکوس اورئوس* به اندازه ۱۵ میلی‌متر بود.

Ashari و همکارش دریافتند که لاکتوباسیلوس دلبروکی جدا شده از نمونه ماست‌های محلی قم از رشد اشرشیاکلی (۱۰/۲میلی‌متر) *استافیلوکوکوس اورئوس* (۹/۸ میلی‌متر) جلوگیری می‌نماید [۲۹].

Pour Ahmad نیز فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس جدا شده از ماست‌های گلپایگان را با دو روش دیسک و چاهک بر علیه اشرشیاکلی (۹ میلی‌متر) *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۱/۳ میلی‌متر) را نشان داد [۳۰].

در مطالعه Ogunbanwo و همکارانش فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین دو سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس* را روی چند پاتوژن بررسی کردند که بیشترین اثر مهارکنندگی را روی باکتری بیماری‌زا *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۲-۸ میلی‌متر) گزارش دادند. نتایج دیگر شامل اثر مهارکنندگی روی *اشیرشیاکولی* (۱۰-۸ میلی‌متر) بود [۳۱] که منطبق بر نتایج مطالعه اخیر بود.

در مطالعه حاضر، سوپرناتانت (لایه رویی) کشت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین توان ضد میکروبی را از خود نشان داد که هاله عدم رشد ایجاد شده توسط این باکتری روی *استافیلوکوکوس اورئوس* (میلی‌متر ۱۵) و *اشیرشیاکولی* (میلی‌متر ۱۳) در روش چاهک بود. کمترین اثر مهاری در روش دیسک روی *استرپتوکوکوس پیوژنز* و در روش چاهک روی پروتئوس ولگاریس مشاهده شد. *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* نیز در بین سویه‌های پروبیوتیکی دیگر، کمترین فعالیت ضد میکروبی را از خود نشان داد.

آنچه در نتایج این مطالعه بارزتر است اثر مهاری قوی‌تر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی هر چهار پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکولی، استرپتوکوکوس پیوژنز، پروتئوس ولگاریس* می‌باشد. در تحقیق انجام شده توسط Savadogo فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک بر علیه سویه‌های استاندارد *باسیلوس سرئوس، انتروکوکوس فکالیس، اشیرشیاکولای و استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط آزمایشگاهی، هاله‌های عدم رشد از ۸ تا ۱۲ میلی‌متر به وجود آورد [۳۲].

مقایسه نتایج به دست آمده در این بررسی با نتایج مطالعه مشابه نشان می‌دهد باکتری‌های اسید لاکتیک دارای فعالیت ضد میکروبی وسیع‌تری علیه باکتری‌های گرم مثبت می‌باشند. در بررسی Ouwehand و همکارانش نشان داده شد که تأثیرات ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک روی باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی است [۳۳].

پیشنهاد می‌شود اولاً تحقیقاتی مشابه و با استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی سویه‌های بومی‌پروبیوتیکی بر روی محصولات لبنی دیگر مانند پنیر، کشک، دوغ و ... نیز انجام شود. ثانیاً نتایج حاصل از مطالعات مشابه در صنایع تهیه و تولید مواد غذایی پروبیوتیک و مکمل پروبیوتیک به کار گرفته شوند.

نتیجه‌گیری

بررسی مناطق جداسازی سویه‌های پروبیوتیک نشان می‌دهد ماست‌های محلی مناطق راویز و چنار دارای پتانسیل پروبیوتیکی بیشتری نسبت به مناطق سرتخت و داوران هستند. در صورت انجام پژوهش‌های تکمیلی و تعیین تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در هنگام مصرف، می‌توان این محصولات را به‌عنوان فرآورده‌های لبنی فرآویژه سنتی معرفی نمود. طی این بررسی، لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک جداسازی شده با تولید مواد ضد میکروبی اثر مهاری قابل توجهی را روی عوامل بیماری‌زا *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیااکولی*، *استرپتوکوکوس پیوژنز* و *پروتئوس ولگاریس* در شرایط بیرونی بدن (محیط کشت) از خود نشان دادند. با توجه به این که شمار اندکی مطالعه در شرایط درونی بدن اثرات مثبت این باکتری‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند برای اثبات دقیق‌تر اثر این دسته از باکتری‌ها در شرایط درونی بدن انسان، به تحقیقات بیشتری نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارشناسان آزمایشگاه کنترل مواد غذایی رفسنجان خانم‌ها عصمت خدادادی، عذری حسینی‌نوه و مریم جلالی به دلیل همکاری‌های بی‌دریغشان کمال سپاسگزاری را داریم.

References

[1] Hoffman FA, Heimbach JT, Sanders ME, Hibberd PL. Executive summary: scientific and regulatory challenges of development of probiotics as foods and drugs. *Clin Infect Dis* 2008; 46 (suppl 2): 53-7.

[2] Knut J, .Probiotic bacteria in fermented foods product characteristics and starter organisms. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2): 374-9.

[3] Aiba Y, Suzuki N, Kabir MA, Takagi A, Koga Y,. Lactic acid mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93(11): 2097-101.

[4] Hammerman C, Bin-Nun A, Kaplan M. Germ warfare: probiotics in defense of the premature gut. *Clin Perinatol* 2004; 31(3): 489-500.

[5] Martin CR, Walker WA. Probiotics: role in pathophysiology and prevention in necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol* 2008; 32(2): 127-37.

[6] Perdigon G. Alvarez S, Richard M, Agüero G, Gpbbato,N. Immune stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 1995; 78(7): 1597-606.

[7] Saxelin M, Korpela R, Mayra-Makinen A. Introduction: classifying functional dairy products. In Functional dairy products. Edited by Mattila-Sandholm T, Saarela M. Woodhead Publishing Limited, UK. 2003; pp: 1-16.

[8] Johnston BC, Supina AL, Ospina M, Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 18;(2): CD004827.

[9] Duffy LC. Interactions mediating bacterial translocation in the immature intestine. *J Nutr* 2000; 130(2 Suppl): 432S-6S.

[10] Vouloumanou EK, Makris GC, Karageorgopoulos DE, Falagas ME. Probiotics for the prevention of respiratory tract infections: a systematic review. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 197.e1-197.e10.

[11] Amy C, Brown RD, and Valiere A. Probiotics and Medical Nutrition Therapy. *Nutr Clin Care* 2004; 7(2): 56-68.

[12] Williams NT. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm* 2010; 67(6): 449-58.

[13] de Roos NM, Katan MB. 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): 405-11.

[14] Shea B. Thesis titled: "isolation, identification and exploitation of lactic acid bacteria from human and animal microbiota". Applied Chemistry and Microbiology of Hilsinki. 2004; 1-28.

[15] Lee B, Bak Y. Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. *J Neuro Gastro Enterol Motil* 2011; 17(3): 252-66.

[16] Martinez FA, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, de Souza Oliveira RP. Bacteriocin production by Bifidobacterium spp. A review. *Biotechnol Adv* 2013; 31(4): 482-8.

[17] Smid EJ, van Enckevort FJ, Wegkamp A, Boekhorst J, Molenaar D, Hugenholtz J, et al. Metabolic models for rational improvement of lactic acid bacteria as cell factories. *J Appl Microbiol* 2005; 98(6): 1326-31.

[18] Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH . Feeding of Bifidobacterium bifidum and Streptococcus thermophilus to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994; 344(8929): 1046-9.

[19] Boris S, Jiménez-Díaz R, Caso JL, Barbés C. Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis U0004.An intestinal isolate with probiotic potential. *J Appl Microbiol* 2001; 91(2): 328-33.

[20] Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci* 2004; 67(2): 309-17.

[21] Brown AC, Valiere A. Probiotics and Medical Nutrition Therapy. *Nutr Clin Care* 2004; 7(2): 56-68.

[22] Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR.Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J Dairy Sci* 1987; 70(1): 1-12.

[23] Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, Editors. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. NewYork: Springer. 2006. pp: 320-404.

[24] Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, et al. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73(2 Suppl): 386S-392S

[25] Gilliland SE, Staley TE, Bush LJ. Importance in bile tolerance of Lactobacillus acidophilus used as a diatery adjunct. *J Dairy Sci* 1984; 67(12): 3045-51.

[26] Chateau N, Deschamp AM, Hadj Sassi A. Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. *Lett Appl Microbiol* 1994; 18 (1): 42-4.

[27] Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP. The effect of Lactobacillus GG on the initiation and promotion of DMH– induced intestinal tumours in the rat. *Nutr Cancer* 1996; 25(2): 197-204.

[28] Heidari Z, Ghaemi N, Ghasemi M. Survey on the activities of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from in situ dairy products. *Lahijan J Biology* 2007; 1(3): 13-22. [Farsi].

[29] Ashari N, Mirdamadi S. Isolation and survey on lactic acid bacteria producing antibacterial sunstances in food industries. Msc thesis from Islamic Azad University of Tehran. 2002; 87-99. [Farsi].

[30] Pour Ahmad R. Using of native probiotic strains in yogurt production. PhD thesis from Islamic Azad University of Tehran. 2003; 98-115. [Farsi].

[31] Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1. *African J Biotechnol* 2003; 2(8): 219-27.

[32] Savadogo A, Cheik A. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk. *Pakistan J Nutrition* 2004; 3 (3): 174-9.

[33] Ouwehand AC, Salminen S, Won A. Antimicobial components from lactic acid bacterial. In microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York, Marcel Dekker Inc. 1998. pp: 139-60.

Isolation of Probiotic Lactobacilli from Traditional Yogurts Produced in Rural Areas of Rafsanjan and their Antimicrobial Effects, 2012

M. Farahbakhsh[1], H. Hakimi[2], R. Bahram Abadi[3], M.R. Zolfaghari[4], N. Doraki[5]

Received: 07/05/2013 Sent for Revision: 23/09/2013 Received Revised Manuscript: 01/10/2013 Accepted: 18/11/2013

Background and Objective: Probiotic bacteria are microbial food supplements with beneficial properties on human health. The increase in the use of industrial dairy products instead of the traditional ones may enhance the possibility of missing the probiotic bacteria. The aim of this study was to isolate lactobacilli from local yogurts produced in rural areas of Rafsanjan and also to investigate their antibacterial effects against four common pathogenic bacteria.

Materials and Methods: In this laboratory study, 40 samples of traditional yogurts from four separated rural areas were collected. Probiotic lactobacilli were isolated using MRS medium, selective screening methods, catalase test, and some relevant biochemical tests. Bactericidal effects of the isolated probiotics against *S.Aureus, E.cloi, S.pyogenes, and P.vulgaris* were investigated using disk diffusion and well diffusion agar methods.

Results: Out of the 40 local yogurt samples, 33 isolates of acid-stable lactobacilli were selected at the first stage. At the next stages, 9 isolates of acid-stable and bile-stable lactobacilli were isolated including; *L .Casei (*in two places*) L.rhamnosus L.plantarum L .acidophilus, L .Bulgaricus, L.delbrueckii, L.fermentum,* and *L.brevis.* While the growth of the 4 pathogenic bacteria was suppressed by all 8 lactobacilli, *L .plantarum* showed the strongest bactericidal effects.

Conclusion: Traditional yogurts may possess probiotic bacteria with antibacterial properties. These probiotics can be used for mass production of industrial dairy producs.

Key words: Probiotic Bacteria, Antimicrobial, Traditional yogurts, *Lactobacillus*

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethrics Committee of Islamic Azad University of Qom approved the study.

How to cite this article: Farahbakhsh M, Hakimi H, Bahram Abadi R. Survey on Isolation of Probiotic Lactobacilli from Traditional Yogurts Produced in Rural Areas of Rafsanjan and their Antimicrobial Effects. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2013; 12(9): 733-46. [Farsi]

1- MSc of Microbiolog, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
2- Associated Prof., Dept. of Microbiology, Immunology of Infectious Diseases Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0391) 5234003, Fax: (0391) 5225209, E-mail: hamid.hakimi@gmail.com
3- BSc of Microbiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
4 -Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Islamic Azad University, Qom Branch, Qom, Iran
5- General Practitioner and PhD Student in Toxicollogy, Food Control Laboratory, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran