مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال پنجم، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۹، صفحات ۵۶-۴۷

تأثیر نمک طعام بر رشد و ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از خمیر ترش نان‌های سنتی استان مرکزی

صبیحه‌السادات علیزاده [۱]، حسین جمالی فر [۲]، نسرین صمدی [۳]، اکرم عیدی [۴]، محمد رضا فاضلی [۵]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۲- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳- استادیار گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۴- استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات
۵- نویسنده مسئول: دانشیار گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران. پست الکترونیکی: mofazeli@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۹

چکیده

سابقه و هدف: اثرات سودمند کشت آغازگر خمیر ترش که شامل باکتری‌های اسید لاکتیکی است، بر بهبود کیفیت و طعم نان ثابت شده است. این باکتری‌ها اثرات ضد قارچی و ضد باکتری دارند و برخی از فراورده‌های حاوی آنها حاوی نمک طعام هستند. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نمک طعام بر رشد و همچنین ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از خمیر ترش بر علیه سه باکتری بیماری‌زا شایع انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تأثیر غلظت‌های مختلف نمک طعام بر رشد دو سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از خمیر ترش به روش شمارش در پلیت بررسی شد. همچنین، تأثیر غلظت‌های مختلف نمک طعام بر ویژگی ضد میکروبی این دو لاکتوباسیلوس به دو روش چاهک و نقطه‌ای به ترتیب با استفاده از محلول رویی و سلول باکتری بر سه باکتری بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلن، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا* مورد بررسی قرار گرفت. میانگین قطر هاله عدم رشد روی محیط *مولر هینتون* آگار اندازه‌گیری و مقایسه شد.

یافته‌ها: تعداد کلی باکتری‌ها در غلظت‌های صفر، ۲٪، ۳٪ و ۴٪ برای هر دو سویه لاکتوباسیلوس به 10^9cfu/ml رسید. در صورتی که در غلظت ۵٪ با حدود نیم لگاریتم کاهش به حدود $7/5\times10^8$ cfu/ml رسید. در غلظت ۷٪ برای *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* تعداد کلی به ترتیب $3/7\times10^6$ cfu/ml و $2/4\times10^5$ به دست آمد. حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد در روش چاهک ۴۹mm بود، در حالی که در روش چاهک به ۲۰/۳mm رسید. بیشترین اثر مهاری روی باکتری‌های بیماری‌زای *استافیلوکوکوس‌اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین اثر مهاری روی *کلبسیلا پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلن مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: هر دو سویه *لاکتوباسیلوس* غلظت‌های نمک طعام را تا ۵٪ به خوبی تحمل کردند، اما *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در غلظت‌های بالاتر نمک طعام مقاومت بیشتری داشت. ویژگی ضد میکروبی هردو *لاکتوباسیلوس* قابل توجه بود؛ اما با افزایش غلظت‌های نمک طعام، قطر هاله عدم رشد، کوچک‌تر شد. این مسئله احتمالاً به دلیل کاهش رشد سلول و به دنبال آن، کاهش تولید اسید لاکتیک در مایع رویی استفاده شده در روش چاهک است. در روش نقطه‌ای، قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های بدون نمک طعام و غلظت‌های بالاتر نمک طعام یکسان بود.

واژگان کلیدی: رشد باکتری، اثر ضد باکتریایی، نمک طعام، خمیر ترش، لاکتوباسیلوس

• مقدمه

نان پر مصرف‌ترین فراورده گندم و مهم‌ترین ماده غذایی موجود در جیره غذایی انسان است که به روش‌های مختلفی تهیه می‌شود. استفاده از خمیر ترش در پخت نان به روش سنتی باعث افزایش نیمه عمر نان می‌شود. همچنین، طعم نان را بهتر و مطبوع‌تر می‌کند. خمیر ترش یک سیستم بیولوژیکی پیچیده از آرد غلات و آب است که به وسیله میکروارگانیسم‌های خاصی تخمیر می‌شود (۱). بیشتر ویژگی‌های مفید خمیر ترش در اثر فعالیت اسیدسازی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

باکتری‌های اسید لاکتیک ایجاد می‌شود. تخمیر خمیر ترش pH مناسبی را برای فاکتورهای اندوژن ایجاد می‌کند که تغییرات بافت را بهبود می‌بخشد (۲) و دلیل سنتز اسید استیک نقش مهمی در طعم دارد (۳). خمیر ترش باعث افزایش حجم و نیمه عمر نان می‌شود و همچنین فساد نشاسته و سفتی و بیاتی نان را به تأخیر می‌اندازد (۵، ۴). باکتری‌های اسید لاکتیک باعث مهار چسبناکی ایجاد شده به وسیله ضایعات باکتری‌ها نیز می‌شود (۶).

ویژگی ضد قارچی لاکتوباسیلوس‌های موجود در خمیر ترش نآنهای سنتی نیز ثابت شده است. فعالیت ضد میکروبی خمیر ترش از طریق اسید استیک، اسید لاکتیک، دی اکسید کربن، دی استیل، اتانول، پراکسید هیدروژن و باکتریوسینِ تولید شده به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک در طول تخمیر ایجاد می‌شود (۷). بعضی مقالات به اثرات منفی نمک طعام بر تولید باکتریوسین اشاره کرده‌اند، در حالی که استفاده از نمک طعام در غلظت‌های پایین در افزایش تولید ساکاسین P و لاکتین ۴۸۱ به ترتیب توسط *لاکتوباسیلوس ساکی* و *لاتوکوکوس لاکتیس* مؤثر است (۸). نمک طعام تأثیر خوبی بر ویژگی‌های اسمزی محیط دارد که مستقیماً بر رشد باکتری‌ها اثر می‌گذارد (۹). در طول تخمیر خمیر ترش، نمک طعام هم بر رشد و هم بر تولید محصول (باکتریوسین) *لاکتوباسیلوس آمیلووروس* DCE 471 تأثیر می‌گذارد. با افزایش غلظت نمک طعام، تولید بیوماس و آمیلوورین L471 کاهش می‌یابد. برعکس، افزودن مقدار کمتری نمک (۱۰ گرم بر لیتر) منجر به بیشترین فعالیت باکتریوسین می‌شود (۱۰).

نمک طعام در محصولات تخمیری حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک مثل پنیر و دوغ به کار می‌رود. نمک طعام نه تنها به عنوان عاملی برای جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا، بلکه به عنوان یک طعم دهنده نیز به ترکیبات غذایی اضافه می‌شود. همچنین، با توجه به نقش مهم نمک طعام در فراورده‌های تخمیری (مثل پنیر، سوسیس و کالباس، ترشیجات، خیار شور و زیتون) و پرورش آبزیان آب‌های شور به عنوان عاملی برای جلوگیری از ضایعات باکتریایی، انتظار می‌رود که درباره تأثیر نمک طعام بر رشد باکتری‌های اسید لاکتیک موجود تحقیق شود. همچنین با توجه به افزایش روزافزون مقاومت دارویی و فراوانی بیماری‌های عفونی و آلودگی‌های غذایی، شناسایی و بررسی روش‌های درمانی جدید و یافتن راه حل‌های جانشین، ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نمک طعام بر تحمل و رشد باکتری‌های اسید لاکتیک و ویژگی ضد میکروبی آنها در ۳ سویه بیماری‌زا (*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلین، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس آئروژینوزا*) انجام شد که از بیماران مبتلا به عفونت ادراری جدا شده بودند.

• مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها: لاکتوباسیلوس‌های مورد نظر از خمیر ترش نآنهای سنتی استان مرکزی جدا شد و مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۰ نمونه سویه جدا شده، دو سویه ای که هاله عدم رشد بزرگ‌تری ایجاد کردند، انتخاب و سپس با استفاده از آزمون‌های تخمیر قندی، آزمایش کاتالاز و رنگ آمیزی گرم شناسایی شدند.

انتخاب و آماده سازی سویه‌های باکتری اسید لاکتیک به منظور بررسی رشد باکتری: به منظور بررسی تأثیر نمک طعام بر رشد لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از خمیر ترش ۵-۴ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از سویه‌ها به محیط کشت اختصاصی آنها MRS broth تلقیح و در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس 5ml از کشت ۲۴ ساعته به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و مایع رویی دور ریخته شد. رسوب حاصل دو بار به وسیله سرم فیزیولوژی استریل شسته و پس از سانتریفوژ مجدد، سوسپانسیون میکروبی تهیه شد. سوسپانسیون تهیه شده ابتدا رقیق شده و 1ml از آن به ارلن مایرهای حاوی ۱۰۰ml محیط کشت MRS broth با غلظت‌های مختلف نمک طعام (۰٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪، ۵٪ و ۷٪) تلقیح شد تا به تعداد نهایی 10^4cfu/ml در هر ارلن رسید. ارلن‌ها در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سپس هر دو ساعت یک بار کدروت محیط کشت، بررسی و تعداد باکتری‌های زنده به روش شمارش در پلیت تعیین شد.

انتخاب و آماده سازی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک به منظور بررسی اثر ضد میکروبی:

آماده‌سازی سویه‌های باکتری اسید لاکتیک به منظور آزمون چاهک: ۵-۴ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته از هر دو سویه لاکتوباسیلوس به لوله‌های حاوی محیط کشت استریل MRS broth با غلظت‌های ذکر شده نمک طعام

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

تلقیح شد. سپس در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۲۴ ساعت، محیط‌های کشت حاوی باکتری رشد کرده به میکروتیوب استریل انتقال داده شدند. سپس آنها با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی برای ادامه مطالعه نگهداری شد.

آماده سازی سویه باکتری‌های اسید لاکتیک به منظور آزمون نقطه‌ای: ۴ تا ۵ کلنی یکدست از کشت ۲۴ ساعته هرکدام از سویه‌ها در محیط کشت MRS broth تلقیح و در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری شد تا کدروت معادل ۰/۵ مک فارلند (10^8cfu/ml) باکتری حاصل شد و برای آزمون نقطه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

آماده سازی باکتری‌های بیماری‌زا: سه سویه استاندارد شامل *استافیلوکوکوس اورئوس ATCC6538P*، *کلبسیلا پنومونیه ATTC10031* و *سودوموناس آئروژینوزا ATCC27853* از کلکسیون میکروبی *آزمایشگاه گروه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران* تهیه شد. همچنین ۹ سویه کلینیکی (سه سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلن، سه سویه *سودوموناس آئروژینوزا* و سه سویه *کلبسیلا پنومونیه*) جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادراری شناسایی شد. سپس به *آزمایشگاه دانشکده داروسازی* انتقال داده شد و در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد تا کلنی‌های خالص ظاهر شد. سپس ۴ تا ۵ کلنی از کشت ۲۴ ساعته هر ۱۲ سویه به ۳ml سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد تا کدروت معادل ۰/۵ مک فارلند (10^8 cfu/ml) ایجاد شد.

بررسی رشد باکتری: از ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر MRS broth با غلظت‌های ذکر شده نمک طعام در فاصله‌های دو ساعت یک بار ۱ml برداشته شد. از آن سری رقت تهیه و سپس به روش شمارش در پلیت روی محیط MRS agar انجام شد. سپس پلیت‌ها در گرمخانه ۳۷°C دارای ۵٪ CO_2 به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، پلیت‌هایی در نظر گرفته شد که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی بودند (۱۱). به منظور کاهش خطا هر آزمون با دو تکرار انجام شد.

بررسی ویژگی ضد میکروبی:

روش چاهک: از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا با سواپ استریل به سطح محیط کشت آگاردار مولر هینتون به طور یکنواخت تلقیح شد. سپس به وسیله چوب پنبه سوراخ کن استریل، چاهک هایی به قطر ۶mm در محیط حفر شد و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی باکتری جدا شده از خمیر ترش در داخل چاهک‌ها ریخته شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. به منظور کاهش خطا هر آزمون با سه تکرار انجام شد.

آزمون نقطه‌ای: در مرکز پلیت‌هایی که حاوی ۲۵ml محیط کشت MRS agar با غلظت‌های ذکر شده نمک طعام بودند، با استفاده از سمپلر ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی لاکتوباسیلوس با کدروت معادل ۰/۵ مک فارلند (10^8 cfu/ml باکتری) قرار داده شد . پس از جذب قطره‌ها پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C دارای ۵٪ CO_2 نگهداری شدند. سپس محیط کشت مولر هینتون با ۰/۷۵٪ آگار حاوی 10^6cfu/ml باکتری بیماری‌زا به صورت لایه نازکی روی سطح پلیت‌های نقطه گذاری شده اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شدند تا باکتری بیماری زا رشد کند و هاله عدم رشد مشاهده شود (۱۱). به منظور کاهش خطا هر آزمون با سه تکرار انجام شد.

روش آماری: محاسبات آماری و آزمون ANOVA در مورد ویژگی ضد میکروبی به وسیله نرم‌افزار Design of Experiment انجام شد.

• یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمون‌های تخمیر قندی (جدول ۱) کاتالاز منفی و باسیل‌های گرم مثبت، بر اساس کتاب *Bergey* (۱۲) نشان داد که نمونه شماره M_1 و شماره M_{14} به ترتیب *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* بودند.

در این تحقیق، ابتدا تأثیر نمک طعام با غلظت‌های متفاوت: ۰ ٪، ۲ ٪، ۳٪، ۴٪، ۵٪ و ۷٪ بر رشد دو سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از خمیر ترش نانهای سنتی استان مرکزی بررسی شد. طبق شکل‌های ۱-الف و ۱- ب هر دو لاکتوباسیلوس تا غلظت ۵٪ نمک طعام را به خوبی تحمل کردند. جدول ۲ تعداد کلی باکتری‌ها را پس از ۲۴ ساعت در غلظت‌های ذکر شده نمک طعام برای هر دو سویه لاکتوباسیلوس نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل، هر دو سویه تا غلظت ۵٪ نمک طعام را به خوبی تحمل کرده، اما افزایش غلظت نمک طعام تا ۷٪ رشد سلول را کاهش داد، به

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

طوری که تعداد باکتری برای لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم به ترتیب به $۱۰^{۶}$cfu/ml و $۱۰^{۵}$cfu/ml رسید. فاز lag در غلظت‌های بالاتر از ۴٪ نمک افزایش یافت و به حدود۸ تا ۱۲ ساعت رسید. در صورتی که در غلظت‌های ۲٪ و ۳٪ این فاز حداقل و در حدود ۱ تا ۲ ساعت گزارش شد.

شکل‌های ۱- ج و ۱- د تأثیر غلظت‌های مختلف نمک طعام بر اسیدیته محیط کشت را نشان می‌دهند. همان طور که مشاهده می‌شود، پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری pH محیط کشت در مورد هر دو سویه لاکتوباسیلوس در غلظت‌های ۰٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪ نمک به کمتر از ۴ کاهش یافت.

همچنین تأثیر نمک با غلظت‌های متفاوت ۰٪، ۲ ٪، ۳٪، ۴ ٪، ۵ ٪ و ۷ ٪ بر ویژگی ضد میکروبی دو لاکتوباسیلوس جدا شده از خمیر ترش بررسی شد. با توجه به نتایج حاصل از این بررسی به روش چاهک که با استفاده از مایع رویی عاری از سلول انجام شد (شکل ۲). ویژگی ضد میکروبی در غلظت‌های ۰٪، ۲٪ و ۳٪ نمک طعام تقریباً یکسان بود ، اما با افزایش غلظت نمک طعام، قطر هاله عدم رشد کوچک‌تر شد. گاهی اوقات، لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی در غلظت ۷٪ نمک طعام هاله کوچکی تشکیل داد که قابل صرف نظر کردن بود. نمک طعام در غلظت‌های بالای نمک تفاوت بسیار معنی‌داری ($p<۰/۰۰۰۱$) بر قطر هاله عدم رشد از خود نشان داد (جدول ۵). تداخل سویه لاکتوباسیلوس و غلظت نمک (AB) و تداخل غلظت نمک و باکتری بیماریزا (BC) نیز بسیار معنی‌دار بود ($p<۰/۰۰۰۱$). این روند کاهش قطر هاله عدم رشد را شاید بتوان به کاهش رشد سلول و در نتیجه، کاهش تولید اسید لاکتیک در حضور غلظت بیشتر نمک طعام مربوط دانست.

بزرگ‌ترین قطر هاله عدم رشد بر روی استافیلوکوکوس اورئوس بوسیله مایع رویی *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به ترتیب با میانگین ۲۰/۳ و ۱۸/۳ میلی‌متر تشکیل شد.

مایع رویی هر دو سویه لاکتوباسیلوس روی همه باکتری‌های بیماری‌زا هاله عدم رشد تشکیل دادند. جدول‌های ۳ و ۴ میانگین بیشترین قطر هاله عدم رشد برای ۴ را نشان می‌دهند. افزایش غلظت نمک، این هاله‌ها حدود ۴ تا ۵ میلی‌متر کوچک‌تر شدند.

جدول ۱- نتایج شناسایی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از خمیر ترش به وسیله آزمایش‌های تخمیری قندی

قند / باکتری	M_1	M_{14}
آرابینوز	+	-
سلوبیوز	+	+
اسکولین	-	+
فروکتوز	+	+
لاکتوز	+	+
مالتوز	+	+
مانیتول	-	+
مانوز	+	+
ملوبیوز	+	-
رافینوز	+	-
رامنوز	-	-
سالسین	-	+
سوربیتول	-	+
ساکاروز	+	+
ترهالوز	+	+
گزیلوز	+	+

جدول ۲- نتایج رشد لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری

باکتری / غلظت نمک	صفر	۲٪	۳٪	۴٪	۵٪	۷٪
لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی	$۲/۹۵ \times ۱۰^{۹}$	$۲/۶ \times ۱۰^{۹}$	$۲/۳۱ \times ۱۰^{۹}$	$۱/۵ \times ۱۰^{۹}$	$۸/۳۵ \times ۱۰^{۸}$	$۴/۴۵ \times ۱۰^{۶}$
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	$۴/۶ \times ۱۰^{۹}$	$۱/۸۲ \times ۱۰^{۹}$	$۱/۷ \times ۱۰^{۹}$	$۹/۵ \times ۱۰^{۸}$	$۷/۳ \times ۱۰^{۸}$	$۲/۴ \times ۱۰^{۵}$

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

جدول ۳- نتایج بزرگ‌ترین هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس کازئی-کاززئی روی ۴ باکتری بیماری‌زا

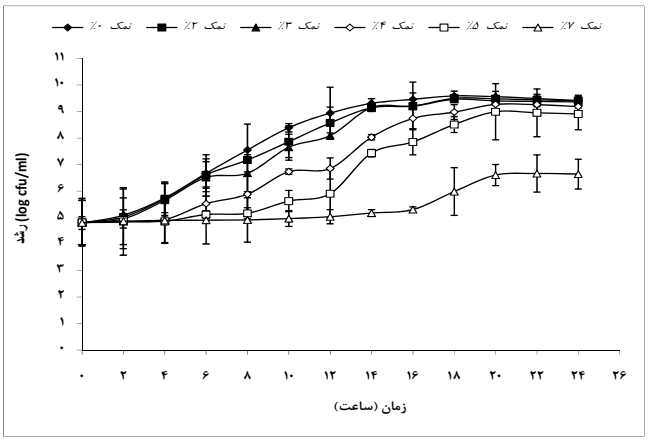
غلظت نمک / باکتری	صفر	٪۲	٪۳	٪۴	٪۵	٪۷
استافیلوکوکوس اورئوس	۲۰/۳*	۲۰	۱۹/۶	۱۶/۳	۱۴/۳	۱۱/۶
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن	۱۵/۶	۱۵/۶	۱۵/۳	۱۳/۶	۱۲/۳	۰
سودوموناس آئروژینوزا	۱۸	۱۸	۱۷/۶	۱۵	۱۳	۱۰/۶
کلبسیلا پنومونیه	۱۵	۱۵	۱۴/۶	۱۲/۶	۱۱	۰

*: قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر درج است.

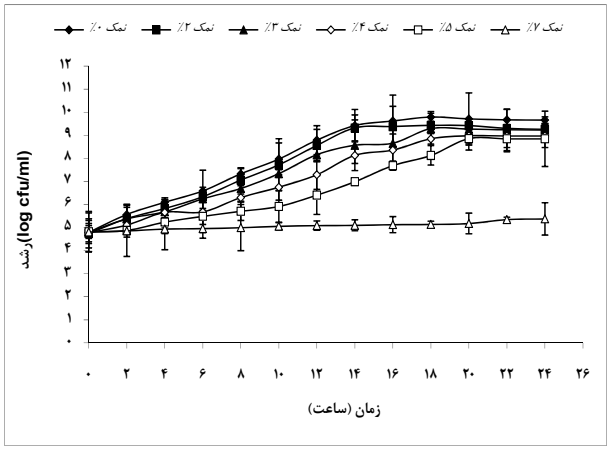
جدول ۴- نتایج بزرگ‌ترین هاله عدم رشد لاکتوباسیلوس فرمنتوم روی ۴ باکتری بیماری‌زا

غلظت نمک / باکتری	صفر	٪۲	٪۳	٪۴	٪۵	٪۷
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۸/۳*	۱۷/۶	۱۷/۶	۱۵/۳	۱۳/۳	۰
استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن	۱۵/۶	۱۵/۳	۱۵	۱۲/۳	۱۱/۳	۰
سودوموناس آئروژینوزا	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸	۱۵	۱۳	۰
کلبسیلا پنومونیه	۱۵	۱۴/۶	۱۴/۳	۱۲	۱۰/۳	۰

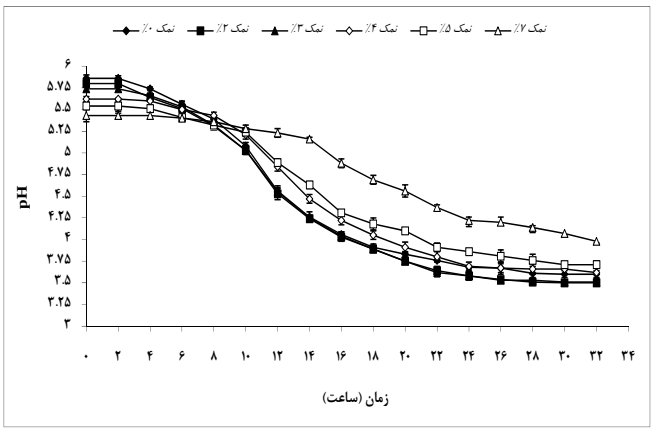
*: قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی‌متر درج است.



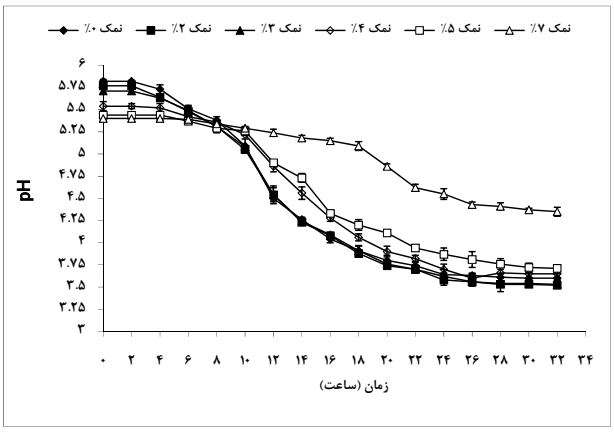
الف



ب



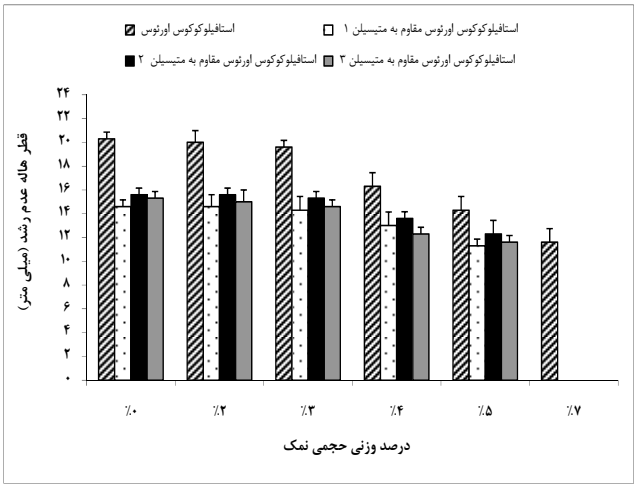
ج



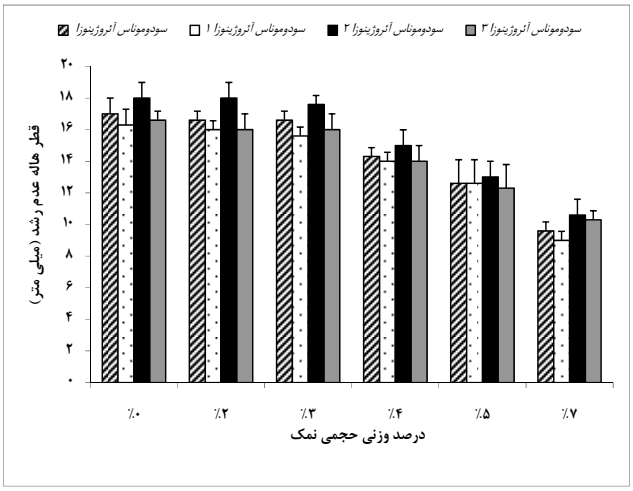
د

شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر الف) رشد لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی؛ ب) رشد لاکتوباسیلوس فرمنتوم؛ ج) pH محیط کشت لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی؛ د) pH محیط کشت لاکتوباسیلوس فرمنتوم

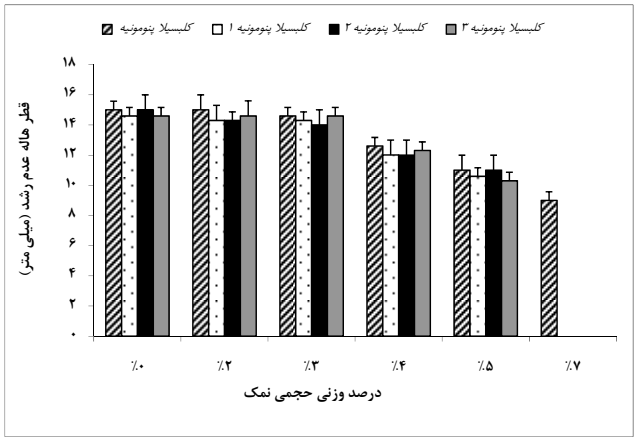
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]



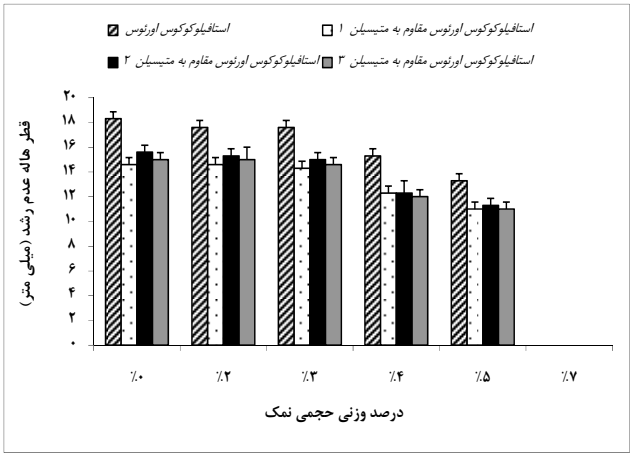
الف



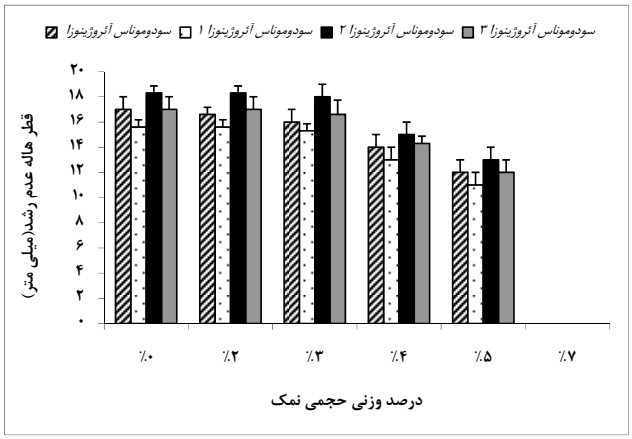
ب



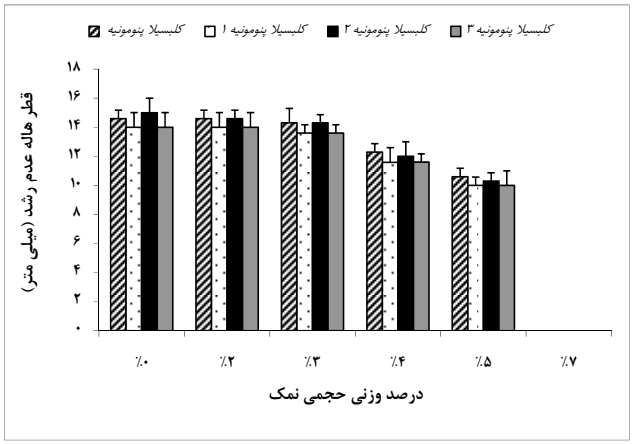
ج



د



ه



و

شکل ۲- تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر اثر ضد میکروبی مایع رویی لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی بر روی الف) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن؛ ب) سودوموناس آئروژینوزا؛ ج) کلبسیلا پنومونیه. تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر روی د) استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن؛ ه) سودوموناس آئروژینوزا؛ و) کلبسیلا پنومونیه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

در بررسی ویژگی ضد میکروبی هر دو سویه لاکتوباسیلوس روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن این هاله کوچک‌تر شد و در غلظت بدون نمک در مورد استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن شماره ۲ هاله‌ای با میانگین ۱۵/۶mm توسط لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم ایجاد شد.

در این مطالعه سودوموناس آئروژینوزا با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۶/۹۷ حساسیت خوبی نسبت به هر دو لاکتوباسیلوس نشان داد. کلبسیلا پنومونیه با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴/۸ و ۱۴/۴ میلی‌متر کمترین حساسیت را به ترتیب نسبت به لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم نشان دادند.

ویژگی ضد میکروبی هر دو لاکتوباسیلوس در شکل‌های ۳- الف و ۳- ب بیانگر تأثیر سلول باکتری روی باکتری‌های بیماری‌زای مورد نظر است. با توجه به جدول ۶ ANOVA قطر هاله عدم رشد در غلظت‌های ذکر شده نمک طعام، تفاوت معنی‌داری نداشت (p>۰/۹). همچنین، تداخل سویه لاکتوباسیلوس و غلظت نمک (AB) و تداخل غلظت نمک و باکتری بیماری‌زا (BC) معنی‌دار نبود.

سودوموناس آئروژینوزا با میانگین قطر هاله عدم رشد ۴۹ و۴۴ میلی متر به ترتیب بیشترین حساسیت را نسبت به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* نشان داد. *استافیلوکوکوس اورئوس* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۴۲ و ۴۱ میلی متر به ترتیب حساسیت خوبی را نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمتوم* نشان داد. همچنین با توجه به شکل‌های ۳- الف و ۳- ب کلبسیلا پنومونیه با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۹/۶ و ۳۹ میلی‌متر و *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متیسیلن با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۴/۶ و ۳۳/۶ میلی‌متر به ترتیب نسبت به *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از خود حساسیت نشان دادند. لازم به ذکر است که به دلیل عدم تحمل غلظت‌های بالای نمک طعام لاکتوباسیلوس‌ها در پلیت‌های حاوی ۷٪ نمک قادر به رشد نبودند و بنابراین، ویژگی ضد میکروبی در این غلظت بررسی نشد.

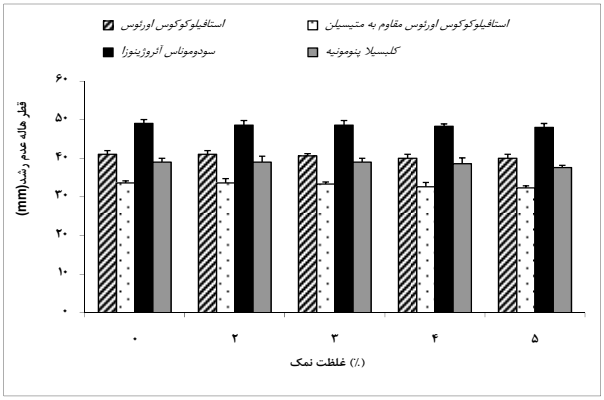
جدول ۵- نتایج محاسبات اماری ویژگی ضد میکروبی به روش چاهک

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش f	ارزش p
مدل	۸۶۹۷/۱۱	۱۴۳	۶۰/۸۲	۲۴/۹۵	<۰/۰۰۰۱
A- سویه لاکتوباسیلوس	۱۱۹/۲۸	۱	۱۱۹/۲۸	۴۸/۹۴	<۰/۰۰۰۱
B- غلظت نمک طعام	۷۰۱۲/۵۹	۵	۱۴۰۲/۵۲	۵۷۵/۳۹	<۰/۰۰۰۱
C- باکتری بیماری‌زا	۸۷۱/۵۳	۱۱	۷۹/۲۳	۳۲/۵۰	<۰/۰۰۰۱
AB	۲۶۳/۹۳	۵	۵۲/۷۹	۲۱/۶۶	<۰/۰۰۰۱
AC	۲۴/۲۵	۱۱	۲/۲۰	۰/۹۰	۰/۵۳۶۵
BC	۲۹۶/۱۶	۵۵	۵/۳۸	۲/۲۱	<۰/۰۰۰۱
ABC	۱۰۹/۳۸	۵۵	۱/۹۹	۰/۸۲	۰/۸۱۷۶
خطای خالص	۷۰۲/۰۰	۲۸۸	۲/۴۴		
هسته کلی	۹۳۹۹/۱۱	۴۳۱			

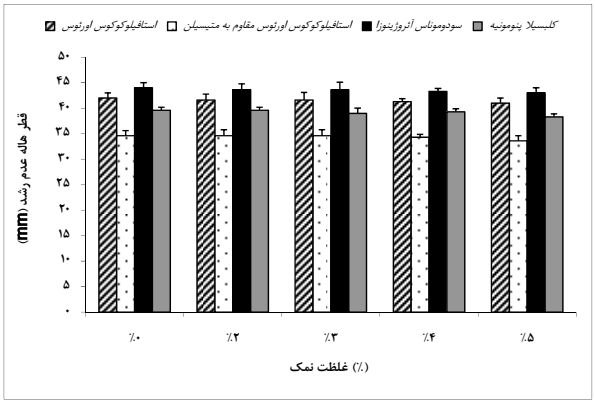
جدول ۶- نتایج محاسبات آماری اثر ضد میکروبی به روش نقطه‌ای

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	ارزش f	ارزش p
مدل	۲۱۴۸/۲۰	۳۹	۵۵/۰۸	۱۰۰/۱۵	<۰/۰۰۰۱
A- سویه لاکتوباسیلوس	۱۲/۸۰	۱	۱۲/۸۰	۲۳/۲۷	<۰/۰۰۰۱
B- غلظت نمک طعام	۳۴/۸۲	۴	۸/۷۱	۱۵/۸۳	<۰/۰۰۰۱
C- باکتری بیماری‌زا	۱۹۹۹/۱۰	۳	۶۶۶/۳۷	۱۲۱۱/۵۸	<۰/۰۰۰۱
AB	۰/۵۷	۴	۰/۱۴	۰/۲۶	۰/۹۰۱۰
AC	۹۷/۳۰	۳	۳۲/۴۳	۵۸/۹۷	<۰/۰۰۰۱
BC	۲/۲۷	۱۲	۰/۱۹	۰/۳۴	۰/۹۷۴۸
ABC	۱/۳۳	۱۲	۰/۱۱	۰/۲۰	۰/۹۹۷۷
خطای خالص	۲۲/۰۰	۴۰	۰/۵۵		
هسته کلی	۲۱۷۰/۲۰	۷۹			

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]



الف



ب

شکل ۳- تأثیر غلظت‌های مختلف نمک بر اثر ضد میکروبی سلول الف) لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی؛ ب) لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر روی استافیلوکوکوس اورئوس؛ استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلن؛ سودوموناس آئروژینوزا؛ کلبسیلا پنومونیه

• بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت‌های بالای نمک بر رشد لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از خمیر ترش اثر داشت و باعث کم شدن رشد هر دو لاکتوباسیلوس شد. به طوری که *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* با افزودن ۷٪ نمک طعام، رشد متوسطی داشت. اما لاکتوباسیلوس فرمنتوم این غلظت نمک طعام را تحمل نکرد و در این غلظت تقریباً رشدی نداشت. در صورتی که هر دو لاکتوباسیلوس غلظت‌های نمک طعام را تا ۵٪ به خوبی تحمل کردند و تا غلظت ۵٪ نمک طعام رشد قابل توجهی از خود نشان دادند. به طور کلی *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* غلظت‌های نمک طعام را بهتر تحمل کرد. همچنین، هر دو سویه توانستند pH محیط را در غلظتهای ۰٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪ نمک طعام تا میزان کمتر از ۴ کاهش دهند. ویژگی ضد میکروبی هر دو سویه *لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در آزمون چاهک در غلظت‌های ۰٪، ۲٪ و ۳٪ تقریباً یکسان بود، اما با افزایش نمک طعام این ویژگی که در اینجا احتمالاً مربوط به اسید لاکتیک موجود در مایع رویی است، کاهش یافت. به علاوه، ویژگی ضد میکروبی هر دو لاکتوباسیلوس در آزمون نقطه‌ای (استفاده از سلول باکتری) در غلظت‌های ۰٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪ و ۵٪ تفاوت معنی‌داری نداشت ($p<0/9$). بنابراین، با توجه به کوچک شدن هاله عدم رشد در آزمون چاهک (مایع روئی) و تغییر نکردن آن در روش نقطه ای (سلول) می‌توان علت کوچک شدن هاله عدم رشد را کم شدن تولید اسید لاکتیک در مایع روئی در غلظت‌های بالاتر نمک طعام دانست. در حقیقت، در این مطالعه به تأثیر نمک طعام بر تولید اسید لاکتیک موجود در مایع رویی پرداخته شد، در صورتی که بسیاری از محققان اثر نمک طعام را بر تولید باکتریوسین‌ها بررسی کرده‌اند.

Rao و همکاران، دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم A6* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم 541* نمک طعام را تا غلظت ۸٪ تحمل کردند، اسید لاکتیک، تولید کرده و pH را به میزان پایین‌تر از ۴ کاهش دادند. اما به طور کلی با افزایش غلظت نمک طعام تولید بیوماس و اسید لاکتیک کاهش یافت (۱۳). در تحقیق حاضر، تحمل دو سویه لاکتوباسیلوس مورد استفاده کمتر بود و فقط تا غلظت ۵٪ نمک طعام را به خوبی تحمل کردند. لاکتوباسیلوس کازئی در غلظت ۷٪ هم رشد متوسطی داشت. هر دو سویه توانستند pH محیط کشت را تا غلظت ۵٪ نمک طعام به میزان کمتر از ۴ کاهش دهند.

رشد سلول لاکتوباسیلوس کورواتوس LTH1174 جدا شده از سوسیس‌های تخمیری به وسیله Verluyten و همکاران مورد مطالعه قرار گرفت. آنها نشان دادند که هم رشد سلول و هم تولید باکتریوسین در غلظت‌های مختلف نمک طعام تغییر کرده است. تولید باکتریوسین در غلظت ۲٪ نمک و بدون نمک یکسان گزارش شد ، اما رشد و تولید باکتریوسین در غلظت‌های بالاتر کاهش یافت (۱۴). در مطالعه حاضر نیز رشد سلول و ویژگی ضد میکروبی در غلظت‌های ۲٪ و۳٪ نمک تقریباً یکسان بود، اما با افزایش نمک، هم رشد و هم ویژگی ضد میکروبی که در اینجا مربوط به اسید لاکتیک موجود در مایع رویی است، کاهش یافت. *Peykov* و همکاران در پژوهش خود بیان کردند که تولید

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

باکتریوسین و فعالیت BLIS در غلظت‌های بالای نمک برای سه سویه انتروکوکوس کاهش یافته است (۹). در مطالعه *Chikthimmah* و همکاران در حضور ۳/۵ ٪ نمک تخریب *E.coli* O157 H7 توسط باکتری‌های اسید لاکتیک کاهش یافت و در حضور غلظت بالاتر از ۵ ٪ نمک در Bologna لبنانی از رشد باکتری‌های اسید لاکتیک جلوگیری شد و تخریب *E. coli* O157 H7 را نیز کم کرد (۱۵). در تحقیق حاضر نیز با افزایش غلظت نمک به بالاتر از ۳٪ ویژگی ضدمیکروبی کم شد و قطر هاله عدم رشد هر سه باکتری (استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا و کلبسیلا پنومونیه) کوچک‌تر شد . همچنین، در غلظت ۷ ٪ نمک رشد لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی کاهش یافت و لاکتوباسیلوس فرمنتوم اصلاً رشدی نداشت.

تحقیقات *Passos* نشان داد که غلظت‌های بالای نمک (در حدود ۱۸٪) تولید اسید لاکتیک را کاهش داده است. علت آن را می‌توان به اثر نمک بر افزایش سرعت مرگ سلول نسبت داد (۱۶). در این تحقیق نیز با توجه به کاهش اثر ضد میکروبی در روش چاهک، می‌توان علت آن را به کم شدن اسید لاکتیک تولید شده نسبت داد.

همچنین *Rozes* و *Peres* بیان کردند که افزایش نمک طعام باعث کاهش رشد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم DSM10492* شده است و در غلظت ۸ ٪ نمک طعام هیچ رشدی دیده نشده است (۱۷). نتایج این تحقیق هم حاکی از آن بود که سویه‌های مورد استفاده قادر به تحمل غلظت‌های بالای نمک مثل ۷٪ و بالاتر نبودند.

طبق گزارش *Roy* نمک طعام بر رشد لاکتوباسیلوس هلوتیکوس میلانو تأثیر گذاشته و باعث کاهش رشد *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس میلانو* شده است، در حالی که تولید اسید ادامه یافته است و این موضوع منجر به کاهش pH یکسان در غلظت‌های ۲٪، ۴٪ و ۶٪ نمک طعام شده است. تولید اسید لاکتیک توسط این باکتری در غلظت‌های بالای نمک طعام نیز کم شده است. در مطالعه حاضر هم مشاهده شد که رشد هر دو لاکتوباسیلوس با افزودن نمک طعام کاهش یافت (۱۸).

Larsen و همکاران گزارش کردند که تولید باکتریوسین باواراسین A توسط *لاکتوباسیلوس باواریکوس* (MI401) جدا شده از خمیر ترش با افزایش غلظت نمک کاهش یافته است و این موضوع منجر به مهار اثر ضد میکروبی ایجاد شده توسط باکتریوسین مذکور بر علیه لیستریا شده است (۱۹). در این تحقیق نیز کاهش اثر ضد میکروبی در برابر افزایش نمک طعام مشاهده شد. با این تفاوت که *Larsen* و همکاران تأثیر نمک را بر تولید باکتریوسین مطالعه کردند.

تحقیقات *Forestier* و همکاران نشان داد که استفاده از مایع رویی لاکتوباسیلوس کازئی رامنوزوس در شرایط invitro بر علیه اشریشیاکلی و کلبسیلا پنومونیه اثر داشته و منجر به کاهش رشد آنها شده است (۲۰). *Takashi* و همکاران به مطالعه اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* shirota بر علیه اشریشیاکلی‌های جدا شده از بیماران مبتلا به عفونت ادرای پرداختند و مشاهده کردند که این لاکتوباسیلوس علیه *E.coli* اثر ضد میکروبی خوبی از خود نشان داده است. در این تحقیق نیز هر دو لاکتوباسیلوس مورد استفاده بر علیه سه باکتری، جدا شده از بیماران مبتلا عفونت ادراری (استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسلا پنومونیه و سودوموناس آئروژینوزا) اثر خوبی داشتند و باعث مهار رشد آنها شدند (۲۱).

با توجه به اینکه لاکتوباسیلوس کازئی-کازئی و لاکتوباسیلوس فرمنتوم جدا شده از خمیر ترش، غلظت‌های تا ۵٪ نمک به خوبی تحمل کردند و رشد خوبی داشتند و با توجه به نقش نمک طعام در فراورده‌های تخمیری مثل ترشیجات، خیار و کلم شور، زیتون و نیز فراورده‌های لبنی مثل پنیر و همچنین وجود باکتری‌های اسید لاکتیک در این فراورده‌ها می‌توان با دانستن الگوی رشد آنها در غلظت‌های مختلف نمک طعام از سویه‌های شناسایی شده در تولید این فراورده‌ها استفاده کرد. در این مطالعه، باکتری‌های جدا شده از خمیر ترش فعالیت آنتاگونیستی خوبی بر علیه باکتری‌های مولد بیماری‌های شایع از خود نشان دادند. بنابراین، استفاده از خمیر ترش به جای بی‌کربنات سدیم توصیه می‌شود. پی بردن به اینکه آیا نمک طعام بر تولید باکتریوسین‌های موجود در باکتری‌های خمیر ترش نیز مؤثر است به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولان محترم *آزمایشگاه گروه کنترل غذا و دارو دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران* که در اجرای این پژوهش به ما یاری رساندند، قدردانی می‌شود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]

• References

1. Sadeghi A. The secret of sourdough: a review of miraculous potential of sourdough in bread shelf life. Biotechnology 2008, 7(3):413-7.
2. Thiele C, Gänzle MG, Vogel RF. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast and cereal enzymes to the generation of amino acid in dough relevant for bread flavour. Cereal Chem 2002, 79(1):45-51.
3. Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A, Di Cango R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends food Sci. Technol 2005, 16 (1-3):57-69.
4. Corsetti A, Gobbetti M, Balestrieri F, Paoletti F, Russi L, Rossi J. Sourdough lactic acid bacteria effect on bread firmness and staling. J Food Sci 1998, 63:347-51.
5. Katina, K. Sourdough: A tool for the improved flavour, texture and shelf life of wheat bread. Helsinki: VTT Technical Research Center of Finland, 2005; 569:13-41, 53-75.
6. Mentes O, Ercan R, Akcelik M. Inhibitor activities of two lactobacillus strain, isolated from sourdough, against rope forming Bacillus strains, Food Control 2007; 18(4):359-63.
7. Fazeli MR, Shahverdi AR, Sedaghat B, Jamalifar H, Samadi N. Sourdogh isolated Lactobacillus fermentum as potent anti- mould preservative of a traditional Iranian bread. Eur Food Res Thechnol. 2004; 218: 554- 6.
8. Gänzle MG, Hertel C, Hammes WP. Modeling the effect of pH, NaCl and nitrite concentration on the antimicrobial activity of sakacin P against Listeria ivanovii DSM 20750. 1996; 76: 409-12.
9. Peykov SI, Raykova D, Dimov SV. NaCl suppression of bacteriocin production by three Enterococcus strains. Trakia J Sci 2008, 6:45-8.
10. Neysens P, Messens W, De Vuyst L. Effect of sodium chloride on growth and bacteriocin production by Lactobacillus amylovorus DCE 471. Int J Food Microbiol 2003, 88:29-39.
11. Fazeli MR, Amirmozafari N, Golbooi nejad R, Jamalifar H. Antagonistic action of watermelon Juice probioticated using different strain of Lactobacilli against Salmonella Typhimurium. Iranian J Publ Health 2007, 36(4):70-3.
12. Kandler O, Weiss N. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology; Baltimore USA. William and Wilkins; Vol:2. 8th ed. 1985. p. 1065-1708.
13. Rao MS, Pintado J, Steven WF, Guyot JP. Kinetic growth parameters of different amylolytic and non-amylolytic Lactobacillus strain under various salt and pH condition. Bioresource Technology 2004; 94:331-7.
14. Verluyten J, Messens W, De Vuyst L. sodium chloride reduces production of Curvacin A, a bacteriocin produced by Lactobacillus curvatus LTH 1174, originating from fermented sausage. Appl Environ Microbiol 2004; 70(4):2271–8.
15. Chikthimmah N, Anantheswaran RC, Roberts RF, Mills EW, Knabel SJ. Influence of sodium chloride on growth of Lactic acid bacteria and subsequent destruction of Escherichia coli O157:H7 during processing of Lebanon Bologna. J Food Prot. 2001; 64:1145-50.
16. Passos FV, Fleming HP, Ollis DF, Felder RM, Mcfeeters RF. kineting and modeling of Lactic acid production by Lactobacillus plantarum. Appl Environ Microbiol 1994; 60:(7): 2627-36.
17. Rozes N, Peres C. Effect of oleuropein and sodium chloride on viability and metabolism of Lactobacillus plantarum. Appl Microbiol Biotechnol 1996; 45(6):839-843.
18. Roy D. salt stress on growth and acid production of Lactobacillus helveticus strain milano. Lett Appl Microbiol 1991; 12:207-11.
19. Larsen AG, Vogensen FK, Josephen J. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sourdough: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by Lactobacillus bavaricus M1401. J Appl Bacteriol 1993; 75(2):113-22.
20. Forestier CH, De Champs CH, Vatoux V, Joly B. Probiotic activities of Lactobacillus casei rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol 2001;152(2):167-73.
21. Takashi A, Koji N, Masaaki W, Teruo Y. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic Lactobacillus casei in a murine model of Escherichia coli urinary tract infection. Antimicrobial Agents Chemotherapy . 2001; 45: 1751-60.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-05-17]