

## ارزیابی محیط های کشت مختلف در رشد و شمارش باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در محصولات شیری

پریناز طاهری<sup>۱\*</sup>، محمدرضا احسانی<sup>۲\*\*</sup>، کیانوش خسروی دارانی<sup>۳</sup>، سید هادی رضوی  
دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران. ۰۹۱۳۳۱۱۴۴۸۰  
دانشکده کشاورزی کرج، دانشگاه تهران. ۰۹۱۲۳۳۰۸۵۰۸  
انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، ص.ب: ۴۷۴۱-۱۹۳۹۵، تهران، ایران  
دانشکده کشاورزی کرج، دانشگاه تهران. ۰۲۶۱-۲۲۴۸۸۰۴

### چکیده

در این پژوهش کارایی پنج محیط کشت مختلف در چهار شرایط گرمخانه گذاری متفاوت، از نظر دستیابی به بهترین شمارش میکروبی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، مورد ارزیابی قرار گرفته است. محیط های مورد ارزیابی، شامل آگارهای MRS، Skim Milk، M17، MRS-bile و MRS با pH اسیدی ۵/۲ بود. شرایط گرمخانه گذاری این محیط ها شامل شرایط هوازی و بی هوازی بود که هر کدام در دو درجه حرارت ۳۷°C و ۴۵°C، به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. نتایج حاصل شده بیانگر برتری کلی درجه حرارت ۳۷°C بود. در این بین محیط MRS agar با شرایط بی هوازی، بهترین شمارش میکروبی را نشان داد، در حالیکه رشدی در محیط MRS agar اسیدی شده، مشاهده نشد. رشد جالب توجه این باکتری روی محیط MRS-bile agar و تحت شرایط بی هوازی و دمای ۳۷°C، مقاومت آن به اسیدهای صفراوی را به صورت in vitro، ثابت می کند. نتایج حاصل از این تحقیق برای ادامه فعالیت در زمینه تولید محصولات پروبیوتیک شیر متمرکز است.  
کلمات کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، غذای عملگر، محیط کشت، شمارش

## Assessment of Different Culture Media for Growth and Enumeration of *Lactobacillus Acidophilus* as a Probiotic Bacteria in the Milk Products

Parinaz Taheri<sup>1\*</sup>, Mohammad Reza Ehsani<sup>2\*\*</sup>, Kianoosh Khosravi-Darani<sup>3</sup>, Seyed Hadi Razavi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Azad Islamic University, Science & Research Campus, Tel: 09133114480, E.mail: [taheriparinaz@yahoo.com](mailto:taheriparinaz@yahoo.com).

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran. Tel:09123308508

<sup>3</sup>National Nutrition and Food Technology Research Institute (Shahid Beheshti College of Medical Science), P.O. Box: 19395-4741, Tehran, Iran. Tel:+98-21-276426, Fax:+98-21-260660, [kiankh@yahoo.com](mailto:kiankh@yahoo.com)

<sup>4</sup>Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Tehran University, Karaj, Iran. Tel:0261-2248804

### Abstract

This study has focused on evaluation of five culture media, and four different incubation conditions to assess their suitability for achieving the best recovery of *Lactobacillus acidophilus*. Bacteriological media evaluated included; M17 agar, MRS agar, MRS-bile agar, and acidified MRS agar (pH;5.20). Incubation was carried out under aerobic and anaerobic conditions at 37°C and 45°C for 72h. The results, show the overall suitability for 37°C temperature, and the best recovery is obtained for MRS agar, under anaerobic condition. But there is no growth on the acidified MRS agar. The interesting growth of *L.acidophilus* on the MRS-bile agar, under anaerobic condition and 37°C, shows the highly resistance of this bacteria to the bile acids.

**Key words:** Probiotic; *Lactobacillus acidophilus*; Functional food, Culture Media, enumeration

### مقدمه

محصولات غذایی پروبیوتیکی که امروزه یکی از مباحث جذاب غذایی، تغذیه ای و درمانی را به خود اختصاص داده اند، جزء غذاهای عملگر طبقه بندی می شوند. غذاهای عملگر به محصولاتی اطلاق می شود که علاوه بر دارا بودن ارزش تغذیه ای، اثرات درمانی و سلامت بخش برای مصرف کننده نیز دارند. بنا به تعریف فولر؛ پروبیوتیک ها مکملهای غذایی میکروبی زنده ای هستند که با تنظیم فلور میکروبی روده و جایگزین شدن در آنجا، باعث ایجاد اثرات مفید و سودمند درمانی و سلامت بخش، برای مصرف کننده می شوند (Fuller, 1989). پس یک باکتری پروبیوتیکی، باید بتواند شرایط تولید و نگهداری را تحمل کرده، در برابر شرایط اسیدی معده، صفرا و نمکهای صفراوی، مقاوم بوده و ترجیحاً جزء میکروفلور طبیعی روده انسان باشد (Lucas, et al, 2004). فرآورده پروبیوتیکی باید در هر گرم حداقل حاوی  $10^6$  باکتری زنده و فعال باشد.

امروزه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، یکی از پررونق ترین باکتریهای پروبیوتیک است که علاوه بر بهبود اختلالات گوارشی، دارای اثرات درمانی مهمی مثل؛ کاهش کلسترول سرم خون، درمان اسهال های کبدی، اثرات ضد سرطانی، افزایش جوابگویی و سیستم ایمنی است. علاوه بر اثرات درمانی، از جذابیت های مصرف این محصولات، ارزش تغذیه ای منحصر به فرد آنهاست؛ سنتز ویتامین ها، هضم مقدماتی پروتئین ها، بهبود جذب کلسیم، متابولیسم لاکتوز و کاهش عدم تحمل لاکتوز، در مورد محصولات لبنی، گوشه ای از ویژگی های تغذیه ای این محصولات است (1998)

<sup>1</sup> functional food -)

(Salminen, دستنیایی به بهترین و کارآمدترین روشها همچنان ادامه دارد. با وجود تحقیقات گسترده هنوز بقاء باکتریهای پروبیوتیکی در طی تولید و نگهداری محصولات تجاری بسیار ضعیف است. در این راستا، دستنیایی به یک روش کارا برای شمارش انتخابی و دقیق این باکتریها ضروری مینماید (1999, Vinderola & Reinheimer; Shah, 2000; Dave, 1996). اکثر روشها و محیط های کشت طراحی شده برای شمارش انتخابی و یا مفرد باکتریهای پروبیوتیکی، از جمله *ال.اسیدوفیلوس*، به علت ضعف بازیابی، با شکست مواجه شده است (Talwalkar, 2004). عدم توانایی شمارش صحیح این باکتریها، منجر به قضاوت نادرست در مورد دستنیایی به حد تعریف شده سلامت بخش بودن این محصولات می شود. در این پژوهش برای اولین بار کارایی محیطهای متداول که تاکنون برای شمارش باکتری پروبیوتیکی *ال.اسیدوفیلوس* مورد استفاده قرار گرفته اند، مقایسه و بررسی شده و بهترین و کارآمدترین محیط و شرایط، به نحوی که کلنی های تشکیل شده به آسانی قابل شناسایی بوده، بازیابی آن حداکثر باشد، معرفی می شوند. نتایج حاصل از این تحقیق برای ادامه فعالیت در زمینه تولید فراورده های پروبیوتیکی شیر مفید فایده خواهد بود.

### مواد و روشها

پنج محیط مورد استفاده، در این آزمایش، جهت شمارش *ال.اسیدوفیلوس* عبارتند از: MRS agar, M17 agar, MRS-bile agar, pH modified MRS agar Skim Milk agar و محیط MRS bile با محیط MRS و سترون سازی آن تهیه شد. به منظور تهیه محیط MRS اسیدی شده، pH محیط با اسید کلریدریک ۱ مولار به ۵/۲ رسید و محیط سترون شد. آماده سازی شیر حاوی *ال.اسیدوفیلوس* از طریق بازسازی ۱۰٪(w/w) شیر خشک بدون چربی کارخانه پگاه تهران، اعمال حرارت در بطری های ۵۰۰ میلی لیتری و یخچال گذاری به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. ۰/۰۱٪(w/w) از کشت تک سویه *ال.اسیدوفیلوس* (LA5, DVS, CHR.Hansen) به صورت خشک شده انجمادی، به شیر با دمای C ۴۰۰ اضافه شد. پس از انحلال کامل و تهیه سری رقت، به صورت pour plate به محیط های مختلف تلقیح شد. هر کشت با سه تکرار، در شرایط هوازی و بی هوازی و در دماهای ۳۷ و C ۴۵ گرمخانه گذاری شد. شرایط بی هوازی به کمک سیستم گاز پک (Merk)، فراهم شد. تکرارپذیری شمارش میکروبی به طور معمول بین ۱٪ ± انحراف معیار داده های اندازه گیری شده در تکرار های مختلف بود.

### نتایج و بحث

جدول ۱ نتایج حاصل از شمارش کلنی ها، روی ۵ محیط مورد آزمایش، در شرایط مختلف چهار گانه را نشان می دهد. داده های جدول نشان می دهد که بر روی محیط اسیدی شده، در هیچیک از شرایط رشدی صورت نگرفت. در ضمن رشد در درجه حرارت C ۴۵، به جز روی محیط MRS agar و شرایط بی هوازی، مطلوب نبوده و رشد و فعالیتی را در پی نداشت. در صورت مشاهده رشد در برخی از محیط ها در شرایط بی هوازی (MRS-bile, Skim Milk agar)، کلنیها بسیار ریز بوده و قابل تشخیص نبودند. این امر تأییدی بر تمایل باکتری *ال.اسیدوفیلوس* به شرایط میاندوستی است. به طور کلی رشد در دمای C ۳۷ رضایت بخش بود، و بازیابی در شرایط بی هوازی، بیشتر از شرایط هوازی کارایی داشت (به جز در مورد MRS-bile agar, Skim Milk agar). با مقایسه کلی پلیتها، بیشترین شمارش میکروبی به ترتیب در MRS-bile agar, M17 agar, MRS agar, Skim Milk agar مشاهده شد. از نظر شکل، کلنی های *ال.اسیدوفیلوس* روی محیط MRS agar، به شکل نامنظم، ستاره ای، زاویه دار و سفید مشخص شدند که داخل محیط کشت و در کف پلیت قرار داشتند. کلنی های کف پلیت به شکل گرد و پهن بودند. شایان ذکر است کلنی های مذکور در شرایط بی هوازی به تعداد بیشتر تر بوده و در سطح نیز مشاهده شدند. در محیط MRS-bile agar، کلنی ها ریز و به شکل نامنظم بودند و اطراف هر کلنی ذرات بسیار ریز مشاهده شد. بازیابی روی این محیط در شرایط هوازی بسیار اندک بود ولی با اعمال شرایط بی هوازی مطلوب شد. در دو محیط M17 agar و Skim Milk agar کلنی ها به صورت بسیار ریز و مات دیده شدند. با آنکه در هر دو محیط شمارش امکان پذیر بود، اما کلنی ها به طور کامل مشخص نبودند. در Skim Milk agar، کلنی ها به صورت ریز و پنبه ای، سفید، نامنظم و مات ظاهر شدند و در شرایط بی هوازی غیر قابل شمارش و ریز بودند. این در حالی بود که در محیط M17 agar، کلنی ها ریز و سرسوزنی بوده و رشد در شرایط بی هوازی بهتر بود. به این ترتیب، بهترین محیط از نظر بیشترین شمارش میکروبی و مشخص بودن کلونی ها، MRS agar در شرایط بی هوازی و دمای C ۳۷ یا C ۴۵ پیشنهاد می شود.

نکته جالب توجه در این تحقیق رشد مطلوب *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* روی محیط حاوی صفرا (MRS-bile)، در شرایط بی هوازی و دمای C ۳۷ می باشد، این امر تأییدی است بر قدرت بقاء این باکتری پروبیوتیکی، در برابر شیرهای صفراوی سیستم گوارش که از عوامل کلیدی اثرات درمانی مطلوب آنها به شمار می رود. در مقابل عدم رشد این باکتری، در محیط اسیدی شده و در کلیه شرایط گرمخانه گذاری، ادعای مقاومت آن در برابر شرایط اسیدی سیستم گوارش را متزلزل می سازد.

جدول ۱. کشت ال. اسیدوفیلوس با تلقیح w/v ۰/۰۱% ، روی ۵ محیط و شرایط مختلف گرمخانه گذاری

محیط کشت	شرایط رشد	تعداد <sup>۱</sup> در میلی لیتر (× ۱۰ <sup>۶</sup> ) در دماهای	
		۳۷ °C	۴۵ °C
MRS agar	هوازی	۲۵/۸۰	۰
	بی هوازی	۳۰/۶۵	۳۰/۲۵
M17 agar	هوازی	۲۰/۶۵	۰
	بی هوازی	۲۴/۱۰	۰
SM agar	هوازی	۲۶/۳۲	غیر قابل تشخیص، ریز
	بی هوازی	غیر قابل تشخیص، ریز	غیر قابل تشخیص، ریز
MRS bile	هوازی	۱۲/۳۳	۰
	بی هوازی	۲۰/۱۶	غیر قابل تشخیص، ریز
MRS 5.20	هوازی	۰	۰
	بی هوازی	۰	۰

#### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران که تامین کلیه تسهیلات اعتباری این طرح را بر عهده داشته، و همچنین از شرکت سهامی صنایع شیر ایران که امکانات اجرایی آن را تقبل نموده است، صمیمانه قدردانی می شود.

#### منابع

- 1- Dave.R.I, & Shah, N.P. 1996. Evaluation of media for selective enumeration of *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, and bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 79, 1529-1536
- 2- Fuller,R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol*, 66, 365-78.
- 3-Lucas,A., Sodini,I., Monnet,C.,et al. 2004. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *Inter Dairy J*, 14, 47-53.
- 4- Salminen,S., Ouwehand, AC. 1998. Clinical application of probiotic bacteria. *Inter Dairy Journal*, 8, 563-72.
- 5- Shah,N.P. 2000. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci*, 83, 894-907.
- 6- Talwalker.A. Kailaspathy.K. 2004. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yogurts. *Inter Dairy J*, 14, 143-9.
- 7- Vinderola.C.G., & Reinheimer.J.A.(1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *Inter dairy J*, 9, 497-505.