نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۳۱، تابستان ۱۴۰۰
ص‌ص: ۴۹~۶۴

اثرات هم‌افزائی و زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک بومی درحضور عصاره‌های گیاهی و تعیین پایین‌ترین غلظت کشنده در شرایط آزمایشگاهی

• **ملیحه حاجی قاسمی[۱]، نرگس واسجی[۲]، مهدیه ایرانمنش[۳]، امیر کریمی ترشیزی[۴]، *ناهید مژگانی[۵]** (نویسنده مسئول)
دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران.

۱. بخش تحقیق و توسعه، شرکت بیوتکنولوژی، فناوری زیستی طبیعت گرا، کرج، ایران.
۲. عضو هیئت علمی بخش پژوهشهای بیوتکنولوژی - مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور - سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
۳. دانش آموخته دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی.
۴. دانشیار، گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس- تهران- ایران.
۵. *بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهران، ایران.

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش : مرداد ۱۳۹۹
شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۶۴۶۰۶۳
Email: dnmoj@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ASJ.2020.126171.1918

چکیده

هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی پتانسیل ضدباکتریایی باکتری‌های پروبیوتیک بومی وعصاره‌های الکلی گیاهی شامل بابونه، رازیانه، نعناع فلفلی وآویشن، علیه چندین باکتری بیماری‌زا بود. باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی (TA0021)*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم (TA0028,TA0026)*، *لاکتوباسیلوس-روتری(TA0034)*، *انتروکوکوس‌فاسیوم (TA0033)* و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی(TA0049,TA00170)* به‌عنوان باکتری‌های پروبیوتیک واستاندارد و *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* به‌عنوان باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرارگرفتند (غلظتی معادل نیم مک‌فارلند). اثر ضدمیکروبی جدایه‌های ذکرشده وعصاره‌های الکلی گیاهی در برابرباکتری‌های بیماری‌زای مذکور با استفاده از روش حفره‌ای یا انتشاردرچاهک انجام شد. اثرات هم‌افزائی مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک و رقت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی در بافر فسفات نمکی (۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و ۱:۱۰۰۰) علیه باکتری‌های ذکر شده نیزمورد بررسی قرارگرفت. زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک منتخب در حضور غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی بعد از ۲۴، ۴۸ تا ۷۲ ساعت تعیین ودرصد زنده‌مانی محاسبه گردید.کم‌ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌ها بر علیه بیماری‌زاها با استفاده از روشMicrodilution assay تعیین شد. همچنین، درصد زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک درحضورغلظت‌های مختلف عصاره‌ها محاسبه گردید. مقدار MIC به عنوان حداقل غلظت عصاره برای ممانعت ازرشد ارگانیسم‌های مورد آزمایش، گزارش شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار و ۶۳ تیمار انجام شدند و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS، مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، سویه‌های اسید لاکتیک و عصاره‌های گیاهی منتخب قادر به مهار رشد باکتری‌های پاتوژن گرم منفی از جمله *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *اشرشیاکولی K99* و *سالمونلا انتریتیدیس* بودند. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *انتروکوکوس فاسیوم* به‌عنوان باکتری پروبیوتیک و عصاره‌های آویشن و نعناع فلفلی حداکثر فعالیت مهارکنندگی را نسبت به *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان دادند. باکتری‌های پروبیوتیک در مجاورت با آویشن و نعناع فلفلی اثرات هم‌افزائی را نشان داده و استفاده هم‌زمان آن‌ها باعث افزایش فعالیت ضدمیکروبی گردید. همچنین باکتری‌های پروبیوتیک در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره‌ها، زنده‌مانی بالای ۷۰٪ را نشان دادند (*P<0/05*). به‌طورکلی، باکتری‌های پروبیوتیک بومی می‌توانند عوامل ضدمیکروبی قوی به‌عنوان جایگزین‌های مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های دامی درآینده باشند.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضدمیکروبی، عصاره‌های گیاهی، پاتوژن، فعالیت هم افزائی، میکروارگانیسم‌های مفید.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 131 pp: 49-64

Synergistic Effects and Viability of Indigenous Probiotic Bacteria in the Presence of Herbal Extracts and Evaluations of their Minimum Inhibitory Concentrations in *invitro* Conditions

By: Maliheh Hajqasemi[1], Narges Vaseji[2], Mahdieh Iranmanesh[3], Amir Karimi Torshizi [4] and *Naheed Mojgani[5]

1-Research and Development Department, Nature Biotech Co.,Karaj

2-Dept. of Biotechnology, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agriculture Research, Education and Extension Organization, Tehran-IR Iran. Phone No: 02634464226 – 09124664436. Fax: 026-34413258

3-Ph.D of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4-Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5-Biotechnology Department. Razi vaccine and Serum research Institute- Agriculture Research, Education and Extension Organization, Tehran-IR Iran

Received: December 2019 **Accepted: August 2020**

The aim of the present research was to investigate the antibacterial potential of local isolates of probiotic bacteria in the presence of herbal extracts including Chamomile *(Matricaria chamomilla*), Fennel *(Foeniculum vulgare)*, Peppermint *(Mentha piperita)* and thyme (*thymus vulgaris*). *Lactobacillus casei (TA0021), L. plantarum (TA0028,TA0026), L.reuteri (TA0034), Enterococcus faecium (TA0033)* and *Pediococcus acidilactici (TA0049,TA00170*) were used as probiotic bacteria, while standard strains of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* were used as indicator organisms (0.5 McFarland turbidity). The antibacterial activity of the mentioned probiotic isolates and the herbal extracts against the selected pathogens were examined by agar well diffusion method. The synergistic effect of the mix of probiotic bacteria and different herbal extracts in PBS (1:10, 1:100 and 1:1000) were also studied. The viability and synergistic inhibitory effect of the selected probiotic bacteria in the presence of different concentrations of herbal extracts were determined after 24, 48 and 72 hours. In order to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC), herbal extracts were serially diluted and their effect on fixed concentrations of the indicator organism was measured by microdilution assay. Similarly, the survival percentage of probiotic bacteria in the presence of different concentrations of the herbal extract was determined. MIC values were recorded as the lowest concentration of extract that was able to inhibit the growth of the pathogens. All experiments were performed in triplicate and results analyzed statistically (Using the SAS Software). According to the results, the selected LAB strains and thyme extracts were able to inhibit the growth of gram negative pathogens including *S. typhimurium, S. enteritidis* and *E. coli* demonstrated maximum inhibitory actions towards the tested pathogens. *L. plantarum* and *E. faecium* probiotic bacteria and peppermint and thyme showed maximum inhibitory actions towards *S. typhimurium*. Probiotic bacteria mixed with thyme and peppermint showed synergistic effects and their combined use resulted in enhanced antibacterial actions. The viability of the probiotic bacteria in the presence of different concentrations of the extracts was above 70% (*P<0/05*). Overall, the locally isolated probiotic bacteria with herbal extracts are strong antibacterial agents that might be suitable alternatives to antibiotics for treatment of livestock diseases in future.

Key words: Antibacterial activity, Herbal extracts, Pathogens, Synergistic actions, Useful microorganisms.

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها گروهی از ترکیبات شیمیایی هستند که به‌صورت بیولوژیکی توسط گیاهان یا میکروارگانیسم‌های معینی (معمولاً قارچ‌ها) تولید می‌شوند. این ترکیبات به منظور کنترل بیماری‌ها و تحریک رشد در پرورش دام و طیور مورد استفاده قرار گرفته و باعث بهبود رشد و بازدهی خوراک می‌شوند (Waldroup و همکاران، ۲۰۰۳). ساز وکار عمل آنتی‌بیوتیک‌ها، ممانعت از استقرار و رشد برخی گونه‌های باکتریایی مضر است، چرا که این گونه‌ها یا توکسین تولید می‌کنند و یا برای مواد مغذی قابل

دسترس با میزبان رقابت می‌کنند (Ayed و همکاران، ۲۰۰۴). با توجه به گسترش مصرف این مواد توسط پرورش دهندگان و متأسفانه ایجاد مقاومت‌های باکتریایی و وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در محصولات طیور از جمله گوشت، استفاده از آن‌ها در صنعت مرغداری و دامداری بسیار محدود گردیده و یا تحت شرایط و ضوابط خاصی مصرف می‌گردند. بنابراین، پرورش‌دهندگان به دنبال شناسایی و جایگزینی افزودنی‌های خوراکی جدیدی می‌باشند تا بتوانند مشکلات ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها را کاهش دهند (Ayed و همکاران، ۲۰۰۴). امروزه افزایش بیماری‌های میکروبی و پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین را بر آن داشته است تا با روش‌های جدید وبه‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید، درمان و کنترل بیماری‌ها را میسر سازند. از سال‌ها پیش، مصرف میکروارگانیسم‌های زنده (پروبیوتیک‌ها) در مواد غذایی به دلیل داشتن اثر سلامت بخشی در میزبان، در کشورهای مختلف جهان رایج بوده است (Sanders, 2000 ;Servin, 2004).

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستندکه در صورت تجویز به میزان کافی، درسلامت بخشی میزبان مفید خواهند بود. این باکتری‌ها با استقرار در بخش‌های مختلف بدن سبب ایجاد سلامت در میزبان می‌گردند (Reid و Burton، ۲۰۰۲). از جمله خصوصیات مهم پروبیوتیک‌ها، غیربیماری‌زا بودن و قابلیت رقابت و تجمع سلولی با باکتری‌های بیماری‌زا است که مانع از اتصال باکتری‌های بیماری‌زا به سطوح دستگاه گوارش می‌شوند (Makras و همکاران، ۲۰۰۶; Koohsari و همکاران، ۲۰۱۵). به‌علاوه، با تولید ترکیبات ضدمیکروبی از ایجاد بیماری جلوگیری می‌کنند (Mahmoudi و همکاران، ۲۰۱۰). همانند پروبیوتیک-ها، ترکیبات متعدد دیگری مانند عصاره‌های گیاهی نیز به‌منظور تسریع رشد و ارتقاء سلامتی در انسان و دام مورد استفاده قرار گرفته‌اند. استفاده از ترکیبات گیاهی برای

درمان بیماری‌ها یک روش قدیمی در دنیا و به‌خصوص کشورهای توسعه یافته است (Elmer, 2001). تاکنون هیچ‌گونه مقاومت به گیاهان دارویی گزارش نشده است. محققین نشان داده‌اندکه افزودن پودر نعناع، به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی، در ایمنی بهتر و به حداقل رساندن استرس اکسیداتیو در جوجه‌های گوشتی موثر است (Arab-Ameri و همکاران، ۲۰۱۶). تأثیرات مفید داروهای گیاهی مثل آویشن و نعناع برعملکرد جوجه‌های گوشتی توسط بسیاری از محققان گزارش شده است (Bento و همکاران، ۲۰۱۳;Ahmed و همکاران، ۲۰۱۶;Pournazari و همکاران، ۲۰۱۷; Wade و همکاران، ۲۰۱۸). ترکیبات فنولی موجود درگیاهان دارویی مانند آویشن، خاصیت شدید ضدباکتریایی و ضدقارچی دارند و سبب از بین رفتن تعادل در غشاء سلولی باکتری و قارچ شده و باعث مرگ آن‌ها می‌شوند. در سال‌های اخیر، مطالعات انجام گرفته اثرات ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها وعصاره‌های گیاهی را اثبات نموده است (Saavedra, 2000 ;Elmer, 2001). استفاده هم‌زمان از پروبیوتیک‌ها و عصاره‌های گیاهی برای افزایش سلامت و بهبود دستگاه گوارش مناسب بوده و سبب تشدید خاصیت ضدمیکروبی پروبیوتیک می‌شود (Reid; Sanders, 2000 وBurto،۲۰۰۲). از آنجایی‌که عصاره‌های گیاهی می‌توانند به رشد پروبیوتیک‌ها آسیب برسانند، ضروری است که غلظت مناسب عصاره‌ها قبل از استفاده این دو ترکیب در تغذیه طیور، انتخاب شود (کم‌ترین غلظتی که اثر آنتاگونیستی بر علیه پاتوژن‌ها را داشته باشد، علاوه براین به زنده-مانی باکتری‌های پروبیوتیک نیز آسیبی وارد نکند). هدف از انجام این تحقیق، بررسی پتانسیل ضدباکتریایی باکتری‌های پروبیوتیک بومی درحضور عصاره‌های گیاهی بابونه، رازیانه، نعناع فلفلی وآویشن در برابر چندین باکتری بیماری‌زا بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، از عصاره‌های گیاهی رازیانه[1]، بابونه[2]، آویشن[3] و نعناع فلفلی[4] استفاده شد. باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی (TA0021)*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم (TA0026,TA0028)*، *لاکتوباسیلوس روتری (TA0034)*، *انتروکوکوس فاسیوم (TA0033)* و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (TA0049,TA00170)* به‌عنوان باکتری‌های

[1] Fennel
[2] Chamomile
[3] thyme
[4] Peppermint

پروبیوتیک واستاندارد و *اشریشیا کولی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس* به‌عنوان باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرارگرفتند (غلظتی معادل نیم مک‌فارلند). تمام آزمایش‌ها در سه تکرار و ۶۳ تیمار انجام شدند.

انتخاب و شرایط رشد باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های شاخص

باکتری‌های اسیدلاکتیک بومی، *لاکتوباسیلوس کازئی(TA0021)*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم(TA0028,TA0026)*، *لاکتوباسیلوس روتری(TA0034)*، *انتروکوکوس فاسیوم (TA0033)* و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (TA0049,TA00170)*، طی مطالعات قبلی جداسازی و از نظر ویژگی‌های پروبیوتیکی بررسی شده بودند (مژگانی، ۱۳۹۵). باکتری‌های اسید لاکتیک مذکور در محیط کشت مایع MRS[5] در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سویه‌ها به نسبت ۱ به ۵ با گلیسیرین استریل مخلوط و درحجم‌های ۵۰۰ میکرولیتری درمیکروتیوپ‌های اپندورف در دمای ۲۰- و یا ۷۰ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (مژگانی، ۱۳۹۵).

باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی در این مطالعه شامل *اشریشیا کولی k99 (RTCC 1254)*، *سالمونلا تیفی‌موریوم (RTCC 1679)* و *سالمونلا انتریتیدیس(RTCC 1648)*، از آرشیو میکروبی بخش میکروب‌شناسی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی تهیه شدند. تکثیر و نگهداری باکتری‌های *اشریشیاکولی* و *سالمونلاتیفی‌موریوم* در محیط‌های آبگوشت انفوزیون مغز و قلب[6] و آبگوشت مغذی[7] انجام شد.

انتخاب عصاره‌های گیاهی

در این تحقیق از ترکیبات عصاره‌های گیاهی تجاری (شرکت باریج اسانس، ایران) شامل عصاره‌های رازیانه، بابونه، آویشن و نعناع فلفلی استفاده شد. عصاره‌های ذکر شده عصاره‌های آبی با غلظت مواد موثره ۱۰ درصد بودند.

بررسی اثر ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک و عصاره‌های گیاهی

خصوصیات آنتاگونیستی سویه‌های پروبیوتیکی و عصاره‌های گیاهی منتخب علیه باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از روش چاهک[8] مورد بررسی گرفت.

به این منظور، ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های پاتوژن با غلظتی معادل نیم مک‌فارلند *(اشریشیاکولیK99*[9]، *سالمونلاتیفی‌موریوم*[10] و *سالمونلا انتریتیدیس*[11])، درون محیط نیمه جامد MRS (آگار۱٪) تلقیح شد و پس از کشت یکنواخت برروی محیط، توسط یک لوله فلزی استریل با قطر ۶ میلی‌متر، حفره‌هایی درون پلیت ایجاد گردید. سپس در هرچاهک، ۲۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری‌های اسید لاکتیک و عصاره‌های گیاهی ریخته و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. درصورت ایجاد هاله عدم رشد در اطراف چاهک، قطر آن با کولیس اندازه‌گیری شد (Hechard و همکاران، ۱۹۹۰؛Todorov and Dicks، ۲۰۰۵).

تعیین ماهیت عامل مهارکننده رشد در باکتری‌های پروبیوتیک

تعیین عامل مهار رشد درمایع روئی کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک پروبیوتیکی مورد نظرکه دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه باکتری‌های بیماری‌زا بودند، به شرح ذیل انجام شد:

مایع روئی کشت استریل طبق روش ذکر شده در قسمت قبل تهیه گردید. در ۶ لوله میکروفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری، ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت افزوده شد. یکی از این لوله‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. pH محتویات لوله دوم، با استفاده از سود یک مولار استریل به ۶/۵ رسانده شد تا اثر احتمالی pH در بروز پدیده آنتاگونیستی بررسی شود. سپس با روش حفره‌ای، اثر ضدمیکروبی سلول کامل، مایع رویی و مایع رویی خنثی شده

---

[5] deMan, Rogosa and Sharpe, merck, use
[6] BHI broth (Merck)
[7] Nutrient broth (Merck)
[8] Agar well diffusion assay
[9] *E.coli K99*
[10] *Salmonella typhi*
[11] *S.enteritidis*

برعلیه باکتری‌های بیماری‌زای ذکر شده، بررسی گردید (Lewus و همکاران، ۱۹۹۱ ;Jin و همکاران، ۱۹۹۸).

بررسی MIC عصاره‌های گیاهی بر علیه پاتوژن‌ها

در آزمایشات قبلی مشخص شد که عصاره‌های آویشن و نعناع فلفلی و باکتری‌های پروبیوتیک منتخب، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی برعلیه باکتری بیماری‌زای *سالمونلا تیفی‌موریوم* را داشتند و به همین دلیل این باکتری درآزمایش‌های بعدی به عنوان باکتری شاخص استفاده شد. حداقل غلظت[12] ممانعت-کنندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی منتخب بر علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* با روش میکرودایلوشن تعیین شد. در ابتدا رقت‌های مختلف عصاره‌ها با استفاده از بافر فسفات نمکی (۱:۱۰، ۱:۱۰۰ و۱:۱۰۰۰) وکشت تازه باکتری بیماری‌زا به صورت سوسپانسیون میکروبی معادل 10^6 cfu/ml تهیه شدند. در هر یک از حفره-های میکروپلیت، یک میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی ریخته و سپس به هر یک از آن‌ها، ۱۰ میکرولیتر ازباکتری تهیه شده، اضافه شد. محیط‌های کشت مایع، با و بدون باکتری شاخص به عنوان کنترل مثبت وکنترل منفی استفاده شدند. در نهایت میکروپلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه-گذاری شدند (Schwarz و همکاران، ۲۰۱۰). زنده‌مانی باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* پس از۲۴ ساعت مجاورت با رقت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی، اندازه‌گیری گردید و درصد زنده‌مانی با در نظر گرفتن کنترل مثبت به عنوان زنده‌مانی صددرصد، محاسبه شد.

بررسی اثرات ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک ترکیب شده با عصاره‌های گیاهی

اثرات هم‌افزائی مجموعه باکتری‌ها و عصاره‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرارگرفت. باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌هایی که طیف وسیع مهاری علیه باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی را نشان دادند، جهت ادامه بررسی انتخاب شدند.

از بین عصاره‌ها، عصاره آویشن و نعناع فلفلی و در بین سویه‌های پروبیوتیک، سه سویه باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس *کازئی (TA0021)*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم (TA0028)* و *انتروکوکوس فاسیوم (TA0033)*، بیشترین فعالیت ضدمیکروبی را علیه باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند و بنابراین، جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند. رقت‌های مختلف عصاره‌ها همراه با پروبیوتیک، مخلوط شده و اثرات ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای مورد نظر طبق روش حفره‌ای اندازه‌گیری شد. قطر هاله‌های شفاف ایجاد شده دراطراف چاهک‌ها برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید.

بررسی زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیکی همراه با عصاره‌های منتخب

پس از تعیین حداقل رقت ممانعت‌کنندگی عصاره علیه باکتری-های بیماری‌زا، تأثیر این میزان بر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی نیز بر طبق همین روش، مورد بررسی قرار گرفت. میزان زنده‌مانی سویه‌ها از طریق شمارش کلنی‌ها به روش پورپلیت[13] در طی بازه-های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرارگرفت.

شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب

باکتری‌های اسید لاکتیک مورد بررسی با استفاده از روش مولکولی در حدگونه شناسایی شدند. استخراج DNA هرنمونه با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده به صورت زیر بود.

27F5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
و'1492R5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3،

دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۵ دقیقه بود. سپس مراحل زیر در سی سیکل انجام شدند:

۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

پس از این مراحل، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور تکمیل سنتز DNA نگه داشته شدند. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز و مشاهده باند1500 bp به معنی تعلق باکتری به جنس لاکتوباسیلوس بود. سپس باندهای بدست آمده پس از تخلیص جهت تعیین سکانس به شرکت 1st مالزی فرستاده شدند. تمامی

[12] Minimal Inhibitory Concentration
[13] Pore plate

سکانس‌های بدست آمده با برنامه Blast [۱۴] در حد گونه شناسایی و ثبت شدند.

تجزیه وتحلیل آماری

این پژوهش در قالب فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۶۳ تیمار و در سه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS نسخه ۲۰ مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفتند. فراسنجه‌های ضدمیکروبی و درصد زنده‌مانی بررسی شدند و اثرات متقابل آن‌ها و اختلاف میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن درسطح اطمینان ۰/۰۵ مقایسه شدند و جهت ترسیم نمودار از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک در برابر باکتری‌های بیماری‌زا

نتایج ارزیابی اثر مهارکنندگی باکتری‌های پروبیوتیک نشان داد که از میان باکتری‌های پروبیوتیک بومی انتخاب شده، باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی(TA0021)*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم(TA0028,TA0026)*، *لاکتوباسیلوس روتری(TA0034)*، *انتروکوکوس فاسیوم (TA0033)* و *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی (TA0049,TA00170)*، دارای بیشترین اثر مهاری بر روی باکتری‌های بیماری‌زا به ویژه *اشریشیا کولی و سالمونلا تیفی‌موریوم* با قطر هاله عدم رشد به طور میانگین بالای ۲۳ میلی‌متر بودند. میانگین قطر هاله عدم رشد *سالمونلا انتریتیدیس* در حضور باکتری‌های پروبیوتیک ۲۰ میلی‌مترتعیین شد.

سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم و لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین اثر ضدمیکروبی را بر روی *سالمونلا تیفی‌موریوم* با قطر هاله ۲۹ و ۲۸ میلی‌متر داشتند و از بین تمامی سویه‌ها بیشترین اثر مهاری را بر روی تمامی باکتری‌های بیماری‌زا، با میانگین قطر هاله ۲۵ و ۲۳ میلی‌متر، از خود نشان دادند (جدول ۱).

[14] blast.ncbi.nim.nih. gov (Nucleotide blast: Basic Local aligment search tool)

جدول ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های پروبیوتیک بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

باکتری‌های پروبیوتیک	*اشریشیا کولی*	*سالمونلا تیفی‌موریوم*	*سالمونلا انتریتیدیس*
TA0021	۲۶	۲۷	۱۵
TA0028	۲۳	۲۸	۲۴
TA0026	۱۸	۱۹	۱۸
TA0034	۲۳	۲۵	۱۹
TA0033	۲۷	۲۹	۲۴
TA0049	۲۵	۲۱	۲۳
TA00170	۲۴	۲۳	۲۰

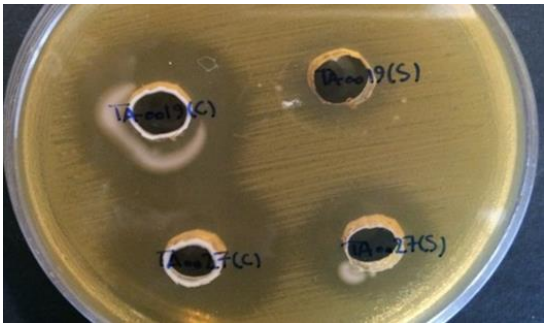
فعالیت ضدمیکروبی عصاره‌ها در برابر باکتری‌های بیماری‌زا

نتایج ارزیابی اثر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی منتخب نشان داد که هر ۴ عصاره مورد بررسی، فعالیت بازدارندگی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مورد استفاده از خود نشان دادند. با اندازه‌گیری قطر هاله‌ها مشخص شد که آویشن و نعناع، بیشترین اثرات ضدباکتری را داشتند. این نتایج کلی نشان می‌دهند که عصاره‌های مورد ارزیابی دارای فعالیت قابل قبولی بودند. نتایج در جدول۲ و شکل ۱ نشان داده شده است.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا در حضور عصاره‌های گیاهی بر حسب میلی‌متر

عصاره‌ها	*سالمونلا انتریتیدیس*	*سالمونلا تیفی موریوم*	*اشرشیا کولی*
نعناع فلفلی	۲۸	۳۱	۱۵
بابونه	۱۹	۱۶	۲۰
آویشن	۲۶	۳۵	۲۱
رازیانه	۱۵	۱۷	۱۲

تمامی باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌های گیاهی مورد بررسی، قادر به از بین بردن باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، با ایجاد بالاترین قطر هاله اطراف چاهک بودند. این باکتری به‌عنوان حساس‌ترین باکتری شاخص در مطالعات بعدی استفاده شد.



شکل ۱- بررسی اثر ضدمیکروبی عصاره‌ها در مقابل باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم

تعیین ماهیت عامل مهارکننده رشد در باکتری‌های پروبیوتیک

همان‌طورکه در جدول ۳ نشان داده شده است، کشت تازه و مایع رویی تقریباً تمامی باکتری‌های پروبیوتیک مورد آزمایش علیه باکتری‌های بیماری‌زا فعال بود و هاله‌های شفاف با اندازه‌های متفاوت ایجاد کردند. اثر ضدمیکروبی کشت باکتری تازه *لاکتوباسیلوس کازئی (TA0021)* به طور معنی‌داری بیشتر از مایع رویی خنثی شده بود ($P<0/05$). درمقابل، فرم کشت تازه باکتری و مایع رویی باکتری در *لاکتوباسیلوس پلانتاروم (TA0028)* و *انتروکوکوس فاسیوم (TA0031)* به طور قابل توجهی دارای اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به فرم مایع رویی خنثی شده بودند ($P<0/05$).

جدول ۳- بررسی اثر ضدمیکروبی مایع رویی و مایع رویی خنثی شده باکتری‌های پروبیوتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا با روش حفره‌ای

باکتری‌های بیماری‌زا	باکتری‌های پروبیوتیک مورد بررسی								
	لاکتوباسیلوس کازئی **TA0021**			*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* **TA0028**			*انتروکوکوس فاسیوم* **TA0031**		
	SN	**S**	**C**	**SN**	**S**	**C**	**SN**	**S**	**C**
اشریشیا کولی	۰^{aA}	۲۰±۱۱/۵۳^{bA}	۲۱±۱۲/۵۲^{bA}	۱۵±۷/۵۴^{abA}	۲۴±۸/۱^{bA}	۲۶±۱۳/۲۲^{bA}	۰^{aA}	۲۰±۱۱^{bA}	۳۱±۱۳/۵۲^{bA}
سالمونلا انتریتیدیس	۰^{aA}	۱۶±۸/۱۸^{abA}	۲۴±۱۳/۲۲^{bA}	۰^{aA}	۲۵±۷/۵۴^{bA}	۳۱±۱۱/۵۳^{bA}	۰^{aA}	۲۰±۱۲/۱۲^{bA}	۳۲±۱۹/۶۷
سالمونلاتیفی‌موریوم	۰^{aA}	۱۵±۹/۱۶^{abA}	۲۲±۱۱/۱۳^{bA}	۰^{aA}	۱۲±۹/۱۶^{abA}	۳۰±۱۳/۱۱	۱۴±۸/۵۴^{abB}	۲۶±۱۱/۵۳^{bA}	۳۰±۱۳/۵۲

(WC (whole cell)**: کشت باکتری تازه، (**S (supernatant fluid)**: مایع رویی باکتری، (**SN (neutralized supernatant fluid)**: مایع رویی خنثی شده. قطر هاله‌های ایجاد شده دراطراف چاهک‌ها به میلی‌متر اندازه‌گیری شد.**

حروف کوچک و حروف بزرگ به ترتیب نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در ردیف و ستون می‌باشند ($P<0/05$).

بررسی اثر ضدمیکروبی مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌های گیاهی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

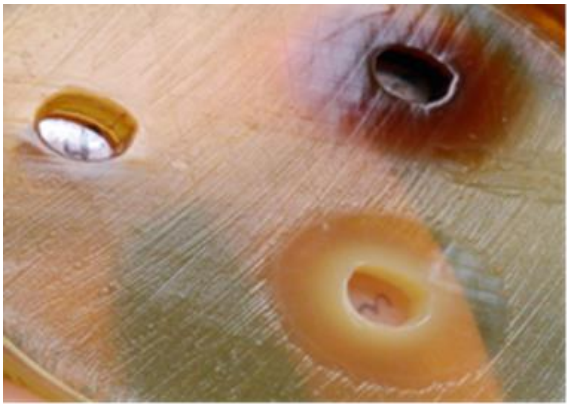
فعالیت مهارکنندگی باکتری‌های پروبیوتیک به همراه عصاره‌ها نشان داد که هر سه باکتری پروبیوتیک منتخب در حضور عصاره-ها اثرات آنتاگونیستی چشمگیری علیه باکتری‌های بیماری‌زا داشتند. اثر ترکیبی باکتری اسیدلاکتیک و عصاره آویشن علیه باکتری‌های بیماری‌زا در شکل ۲ نشان داده شده است. طبق جدول ۴ که فعالیت سه سویه پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *انتروکوکوس فاسیوم* را به همراه هر ۴ عصاره نشان می‌دهد، همگی بالاترین میزان اثرگذاری را در برابر باکتری‌های بیماری‌زا داشتند که نشان‌دهنده اثر سینرژیسمی ترکیب عصاره و باکتری است. تفاوت معنی‌دار بین انواع باکتری پروبیوتیک مورد بررسی بر علیه پاتوژن‌ها و یا همراه با عصاره دیده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول٤-میانگین±انحراف معیار قطر هاله عدم رشد در کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌های گیاهی بر علیه باکتری های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر

باکتری شاخص	*اشرشیاکلی*	*سالمونلا انتریتیدیس*	*سالمونلا تیفی موریوم*
TA۰۰۲۱+۱۱۶	۳۴±۱۲/۵۲^{aA}	۳۰±۱۱/۱۳^{aA}	۳۰±۹/۶۴^{aA}
TA۰۰۲۱+۱۱۷	۲۹±۹^{aA}	۲۱±۶/۵۵^{aA}	۲۳±۱۰/۱۴^{aA}
TA۰۰۲۱+۱۱۸	۳۰±۱۵^{aA}	۳۵±۱۲/۵۲^{aA}	۳۱±۱۰/۵۳^{aA}
TA۰۰۲۱+۱۱۹	۲۶±۹/۱۶^{aA}	۲۵±۸/۸۸^{aA}	۲۵±۸/۷۱^{aA}
TA۰۰۲۸+۱۱۶	۳۵±۸/۸۸^{aA}	۳۰±۱۲/۱۲^{aA}	۳۱±۹/۶۹^{aA}
TA۰۰۲۸+۱۱۷	۲۱±۸/۵۴^{aA}	۱۷±۱۱^{aA}	۱۲±۸^{aA}
TA۰۰۲۸+۱۱۸	۳۰±۱۰/۵۳^{aA}	۲۸±۱۲/۵۲^{aA}	۲۸±۹/۵۳^{aA}
TA۰۰۲۸+۱۱۹	۲۵±۱۳/۵۲^{aA}	۲۲±۱۱/۵۳^{aA}	۲۴±۱۱/۷۸^{aA}
TA۰۰۳۳+۱۱۶	۳۰±۱۳/۱۱^{aA}	۲۶±۱۰/۵۳^{aA}	۳۰±۱۱/۵۳^{aA}
TA۰۰۳۳+۱۱۷	۲۰±۱۰/۵۳^{aA}	۲۱±۹/۶۴^{aA}	۲۴±۱۰/۱۴^{aA}
TA۰۰۳۳+۱۱۸	۳۰±۸^{aA}	۳۰±۱۰/۱۴^{aA}	۳۰±۱۰/۵۳^{aA}
TA۰۰۳۳+۱۱۹	۲۶±۱۱/۱۳^{aA}	۲۵±۱۲/۵۲^{aA}	۲۵±۹/۵۲^{aA}

حروف کوچک و بزرگ به ترتیب در ردیف و ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

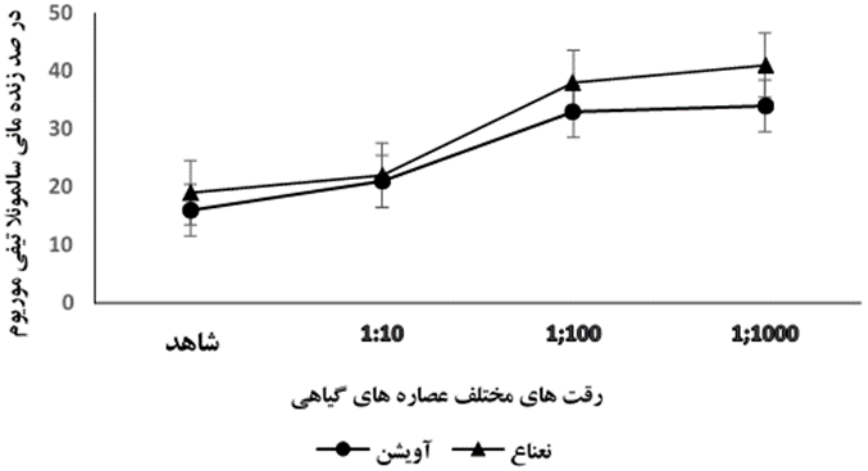
عصاره‌های گیاهی مورد بررسی شامل: ۱۱۶: عصاره نعناع، ۱۱۷: عصاره بابونه، ۱۱۸: عصاره آویشن، ۱۱۹: عصاره رازیانه همراه با باکتری‌های پروبیوتیک شامل: باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی (TA0021)*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم (TA0028)* و *انتروکوکوس فاسیوم (TA0033)* *بودند.*



شکل ۲- اثر ترکیبی باکتری اسیدلاکتیک و عصاره آویشن علیه باکتری بیماری‌زا

بررسی MIC عصاره‌های گیاهی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

نتایج تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی آویشن و نعناع بر علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در نمودار ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج به‌دست آمده، عصاره آویشن اثر بیشتری علیه باکتری‌های بیماری‌زای مذکور داشت و در صد زنده‌مانی این باکتری‌ها در حضور رقت‌های مختلف عصاره آویشن کمتر از زنده‌مانی در عصاره نعناع فلفلی بود. در تمامی رقت‌های مورد استفاده عصاره‌ها، زنده‌مانی باکتری پاتوژن کمتر از ۵۰٪ بود و با افزایش رقت درصد زنده‌مانی نیز افزایش یافت.



نمودار ۱ - درصد زنده‌مانی *سالمونلا تیفی موریوم* در حضور رقت‌های مختلف آویشن و نعناع فلفلی طی ۲٤ ساعت *(P<۰/۰۵)*

بررسی زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیکی در حضور عصاره‌های گیاهی منتخب

نتایج تعیین حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی ترکیب عصاره‌ها و باکتری‌های پروبیوتیک نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیکی انتخاب شده در رقت‌های مورد استفاده عصاره‌های گیاهی، به مدت زمان ۲۴ ساعت زنده می‌ماندند (جداول ۵ و ۶). تمامی سویه‌های پروبیوتیک قادر به رشد در بالاترین غلظت عصاره‌های مورد ارزیابی بوده و در کنار آن‌ها اثر بخشی بهتری را از خود نشان دادند. درصد زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مقابل رقت‌های مختلف عصاره آویشن پس از ۲۴ ساعت افزایش یافت اما تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها مشاهده نشد ($P>0.05$). درحالی که درصد زنده‌مانی باکتری *TA0021* و *TA0028* پس از ۲۴ ساعت در مقابل عصاره نعناع نسبت به حالت کنترل یا رقت صفر به طور قابل توجهی کاهش داشت ($P<0.05$) اما در مورد باکتری *TA0033* در رقت ۱:۲ بیشترین درصد زنده‌مانی و سپس کاهش مشاهده شد.

جدول ۵- در صد زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک منتخب علیه غلظت‌های مختلف آویشن طی ۲۴ ساعت

باکتری	عصاره آویشن			
	شاهد	۱:۱۰	۱:۱۰۰	۱:۱۰۰۰
TA0021	۸۳±۱۲[a]	۸۹±۱۳[a]	۹۴±۱۰/۸۱[a]	۹۸±۱۶/۵۲[a]
TA0028	۸۶±۱۱[a]	۸۰±۱۰/۵۳[a]	۸۹±۱۳/۵۲[a]	۸۹±۱۱/۵۳[a]
TA0033	۸۴±۱۰/۸۱[a]	۸۹±۱۳/۵۲[a]	۹۰±۱۰/۵۳[a]	۹۲±۱۲/۱۶[a]

حروف کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در رقت‌های مختلف مربوط به هر عصاره در انواع باکتری می‌باشد ($P<0.05$).

جدول ٦- تعیین MIC زنده‌مانی سویه‌های پروبیوتیک (cfu/ml) درحضور رقت‌های مختلف عصاره نعناع فلفلی

باکتری‌های پروبیوتیک	بدون رقت	عصاره نعناع فلفلی ۱:۲	۱:۴
لاکتوباسیلوس کازئی ***TA0021***	7.5×10^{7b}	1.5×10^{8a}	2.45×10^{8a}
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ***TA0028***	7×10^{7b}	1×10^{8a}	1.50×10^{9a}
انتروکوکوس فاسیوم ***TA0033***	1.6×10^{8a}	4×10^{8b}	1.5×10^{8a}

حروف کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در رقت‌های مختلف مربوط به هر عصاره در انواع باکتری می‌باشد. ($P<0.05$)

بحث

تحقیق جهت کشف مواد جدید با خواص ضدمیکروبی قوی‌تر، به موازات افزایش مقاومت در باکتری‌ها رو به گسترش است. با توجه به استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی از دیرباز، این ترکیبات به عنوان یک انتخاب مناسب در درمان بیماری‌ها به شمارمی‌روند (Koohsari و همکاران، ۲۰۱۵). عصاره‌های حاصل از گیاهان و باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها، دارای اثرات ضدمیکروبی شناخته شده‌ای هستند که می‌توانند به عنوان جایگزین نگهدارنده‌های شیمیایی جهت کنترل و جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرند (Mahmoudi و همکاران، ۲۰۱۰). مواد موثر موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردارند. بنابراین، در بدن انباشته نشده و اثرات جانبی به بار نمی‌آورند و از این رو امتیاز و برتری قابل توجهی نسبت به داروهای شیمیایی دارند و به صورت سنتی برای درمان و کنترل بسیاری از بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. اسانس‌ها به‌طور نامنظمی در تمامی قسمت‌های گیاه پخش شده‌اند اما غالباً در برخی از غده‌های مخصوص یا در داخل بافت یا در اپیدرم گیاه متمرکز می‌باشند. این مواد از نظر ترکیب شیمیایی همگن نیستند؛ بلکه به صورت ترکیبات مختلفی مشاهده می‌شوند و معمولاً متعلق به ترپن‌ها، الکل‌ها، استرها، آلدئیدها، فنول‌ها، اترها و یا پراکسیدها می‌باشند و عموماً به اسانس (Essential oil) نیز معروف می‌باشند (Bassett, 2000). تحقیقات نشان داده است که افزودن گیاهان دارویی به رژیم غذایی پرندگان، میکروفلور روده‌ای آنان را تعدیل می‌نماید (Youn- and Noh, 2001). همچنین ثابت شده است که برخی از اسانس‌های گیاهی دارای اثرات آنتی‌سپتیک و ضدمیکروبی، اثرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی متعددی هستند (Koenen و همکاران، ۲۰۰۴). مکانیسم اثر این عصاره‌ها در مدل‌های حیوانی شامل حل شدن در غشاء سیتوپلاسمی و اثر بر روی ساختمان آنزیم و از بین بردن

بیماری‌زاها، ایجاد اختلال در انتقال الکترون در زنجیره تنفسی، ایجاد وقفه در فسفوریلاسیون اکسیداتیواست (Mahmoudi و همکاران، ۲۰۱۰).

در مطالعه حاضر هر ۴ عصاره گیاهی مورد بررسی، فعالیت ضدمیکروبی خوبی را در برابر باکتری‌های بیماری‌زا بخصوص *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم* نشان دادند (Sadeghi و همکاران، ۲۰۱۵). نتایج نشان دادند که بیشترین میزان هاله عدم رشد توسط این عصاره‌ها به ترتیب، برای بابونه ۹ میلی‌متر، آویشن ۱۷ میلی‌متر، نعناع ۱۷ میلی‌متر، شیرین بیان و پونه ۱۲ میلی‌متر مشاهده شد و لذا عصاره آویشن و نعناع با بهترین تأثیر گزارش شدند. به طور مشابهی، اثرات ضد میکروبی اسانس آویشن علیه باکتری‌های بیماری‌زائی نظیر *اشریشیا کولی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *هلیکوباکترپیلوری* نیز مشاهده گردید.

(Tabak و همکاران، ۱۹۹۶ Rasooli and Rezaei, 2002;). ایران از غنی‌ترین مناطق دنیا از حیث تعداد و تنوع گیاهان دارویی و باکتری‌های پروبیوتیک بومی است که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه داشته باشند. طی مطالعات مختلف انجام شده بر روی عصاره‌های گیاهی انواع آویشن (Sadeghzadeh و همکاران، ۲۰۰۶؛Mashak و همکاران، ۲۰۱۲)، پونه (Rasouli و همکاران، ۲۰۰۸؛ Mahmoudi و همکاران، ۲۰۱۰)، مرزه (Mahboubi و فیض‌آباد، ۲۰۰۹؛ Mojab و همکاران، ۲۰۰۹)، بابونه (Saderi و همکاران، ۲۰۰۷)، نعناع فلفلی (Alvandi و همکاران، ۲۰۱۱) نشان داده شد که این گیاهان بر روی باکتری‌هایی از قبیل *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کولی* و *سودوموناس ائروژینوزا* مؤثر بودند. اثرات ضدمیکروبی عصاره‌های بابونه، آویشن، نعنا، شیرین بیان و پونه در برابر باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی قرارگرفتند. در مطالعه‌ای، تمامی عصاره‌های الکلی گیاهان مورد بررسی، حداکثر میزان هاله عدم رشد، یعنی تا ۳۰ میلی‌متر را در برابر باکتری‌های بیماری‌زا مورد بررسی از خود نشان دادند (Eftekhar و- همکاران، ۲۰۰۹)

همان‌طورکه در نتایج این تحقیق ذکر گردید، باکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه میزان فعالیت ضدمیکروبی معنی‌داری بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند. اثرات ضدمیکروبی گونه‌های لاکتوباسیلوس در برابر عوامل بیماری‌زا نظیر *اشرشیاکلی* (Jin و همکاران، ۱۹۹۸)، *سالمونلا*، *کمپیلوباکتر* و *ایمریا آسرولینا* (Dalloul و همکاران،- ۲۰۰۳)، قبلاً نیز گزارش شده است. ساز وکار عمل پروبیوتیک‌ها در ممانعت از استقرار باکتری-های بیماری‌زا شامل رقابت برای مواد مغذی، تولید ترکیبات و شرایط ضدمیکروبی (اسید چرب فرار، باکتریوسین و کاهش pH)، رقابت برای جایگاه‌های جذب اپیتلیوم روده و تحریک سیستم ایمنی است (Rolfe, 2000). به عنوان مثال، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* می‌تواند پس از جایگزین شدن در روده طیور، اسیدوفیلین، لاکتواسیدین و اسیدولین تولید نماید که باعث کاهش رشد و از بین رفتن باکتری‌های مضر می‌شوند (افشار مازندران و رجب،۱۳۸۱). در تحقیق حاضر، خواص و اثرات سینرژیکی (هم-افزایی) باکتری‌های پروبیوتیک بومی با درصدهای مختلف چهار نوع عصاره گیاهی ارزیابی شد. فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند با چند روش ارتقا یابد. انتخاب سویه‌هایی با بهره‌وری بیشتر، دستکاری ژنتیکی، استفاده ترکیبی از چند سویه باهم و استفاده از خاصیت سینرژیکی (هم‌افزایی) ترکیبات. بر اساس یافته‌های این تحقیق، به نظر می‌رسد این روش بهترین رویکرد برای افزایش بهره‌وری از پروبیوتیک‌ها است. با ترکیب متناسب باکتری‌های پروبیوتیک با عصاره‌ها می‌توان یک ماده بیولوژیک بی‌خطر به‌عنوان جایگزین آنتی بیوتیک را با کاربرد بهتر جهت کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا و جلوگیری از بیماری‌های گوناگون معرفی نمود. به‌طورکلی در این تحقیق، استفاده از پروبیوتیک‌ها و همچنین فیتوبیوتیک (عصاره‌های گیاهی) و پروفیت (باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌های گیاهی)، تأثیر ضدمیکروبی درحدآنتی‌بیوتیک از خود نشان داده‌اند. با توجه به نگرانی‌های موجود در رابطه با اثرات مصرف آنتی‌بیوتیک به-عنوان محرک رشد در گله‌های گوشتی می‌توان از این افزودنی‌ها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک نام برد.

نتیجه‌گیری

درتحقیق حاضر، خواص و اثرات سینرژیکی (هم‌افزایی) باکتری-های پروبیوتیک بومی با درصدهای مختلف چهار نوع عصاره-گیاهی ارزیابی شد. فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک با چند روش ارتقاء می‌یابد. بر اساس یافته‌های این تحقیق به نظر می-رسد این روش، بهترین رویکرد برای افزایش بهره‌وری از پروبیوتیک‌هاست. با ترکیب متناسب باکتری‌های پروبیوتیک با عصاره‌ها می‌توان به یک ماده بیولوژیک بی‌خطر به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک با کاربرد بهتردست یافت که جهت کاهش جمعیت باکتری‌های بیماری‌زا و جلوگیری از بیماری‌های گوناگون، مورد استفاده قرار گیرد. به‌طورکلی در این تحقیق، استفاده از پروبیوتیک‌ها، فیتوبیوتیک‌ها (عصاره‌های گیاهی) و مخلوط هر دو (باکتری‌های پروبیوتیک و عصاره‌های گیاهی) که پروفیت نامیده شد، تأثیر ضدمیکروبی بالایی قابل مقایسه با آنتی-بیوتیک‌های رایج از خود نشان دادند. علاوه براین، عصاره‌های گیاهی بر میزان رشد و تعداد باکتری‌های پروبیوتیک منتخب اثرات متفاوت داشتند. مخلوط باکتری‌های پروبیوتیک با عصاره-های آویشن و نعناع فلفلی، بیشترین اثرات ضدمیکروبی بر علیه باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمایش را نشان دادند.

هرچند لازم است قبل از استفاده و ترکیب کردن عصاره و باکتری، دز مناسب عصاره‌ها بررسی گردد، زیرا این عصاره‌ها حاوی ترکیبات ضدمیکروبی بوده و در صورت استفاده از دز نامناسب، سبب از بین رفتن زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک می-گردد. بنابراین، مقدار دقیق آن (از نظر اثرات بر زنده‌مانی باکتری-های پروبیوتیک و کاهش رشد باکتری‌های بیماری‌زا) جهت بهبود اثرات سینرژیکی، بسیار مهم می‌باشد. جهت تضمین اثرات موثر این ترکیب (پروفیت)، توصیه می‌شود اثرات آن در شرایط درون تنی در طی دوره رشد طیورگوشتی نیز ارزیابی شود. با نتایج حاصله در این تحقیق و با توجه به نگرانی‌های موجود در رابطه با اثرات منفی مصرف آنتی‌بیوتیک به‌عنوان محرک رشد در گله‌های گوشتی می‌توان از این افزودنی‌ها به‌عنوان جایگزین طبیعی و ایمن آنتی‌بیوتیک‌ها نام برد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق طی پروژه مصوب صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور با عنوان "تولید نیمه صنعتی مکمل غذایی طیور با استفاده از سویه‌های پروبیوتیکی و گیاهان دارویی" و با شماره ۹۲۰۴۴۴۶ (تاریخ تصویب ۹۳/۱۰/۳۰) انجام گردید. نویسندگان این مقاله از همکاران در موسسه واکسن و سرم‌سازی رازی و بخش تحقیق و توسعه شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا (بایوران) که ما را در انجام این تحقیق یاری و همراهی کردند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

افشار مازندران، ن. رجب، ا. (۱۳۸۱). پروبیوتیک‌ها و کاربرد آن‌ها در تغذیه دام و طیور(چاپ دوم). انتشارات نوربخش، تهران. ص. ۲۸۶-۲۹۵.

- Ahmed A.M.H. El-Sanhoury M.H.S. and Mostafa M.M.E. (2016). Effect of peppermint extracts inclusion in broiler chick diet on chick performance, plasma constituents, carcass traits and some microbial populations, enzymatic activity and histological aspects of small intestine. *Asian Journal Animal Veterinary Advance*. 11: 441-451.
-Alvandi K. Sharifan R.and Aghazadeh M.M. (2011).Study of chemical composition and antimicrobial activity of peppermint essential oil. *Iranian Journal of Pathology*.7 (4): 355 - 363.
-Arab Ameri S. Samadi F. Dastar B. and Zerehdaran S. (2016).Effect of peppermint *(Mentha piperita)* powder on immune response of broiler chickens in heat stress. Iran. *journal applied animal science*. 6: 435-445.
- Ayed M.H. Laamari Z. and Rekik B. (2004). Effects of incorporating an antibiotic "Avilamycin" and a probiotic "Activis" in broiler diets. Proc. Western Section, *American Society* of *Animal Science*. 55: 237-240.

-Bassett R. (2000). Oregano's positive impact on poultry production. *World Poultry*.16:31-34.

-Dalloul R.A. Lillehoj H.S. Shellem T.A. and Doerr J.A. (2003). Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus*-based probiotic. *Poultry Science.* 82: 62-66.

- Bento M.H.L. Ouwehand A.C. Tiihonen K. Lahtinen S. Nurminen P. Saarinen M.T.et al. (2013). Essential oils and their use in animal feeds for monogastric animals - Effects on feed quality, gut microbiota, growth performance and food safety: a review. *veterinary medicine journal*(Praha). 58: 449-458.

-Eftekhar F. Nariman F. Yousefzadim M. Hadiand J. and Ebrahimi SN. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity and essential oil composition of Thymus caramanicus from Iran. Natural product communications. 4 (8):1139-42.

-Elmer G.W. (2001). Probiotics: "living drugs". *American Journal of health-system pharmacy*. 58 (12):1101-9.

-Hechard Y. Dherbomez M. Cenatiempo Y. and Letellier F. (1990). Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'. Letters in applied microbiology. 11 (4):185-8.

-Jin L. Ho Y.W. Abdullah N. Ali M. and Jalaludin S. (1996). Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. Letters in Applied Microbiology. 23 (2):67-71.

-Jin L.Z. Ho Y.W. Abdullah N. and Jalaludin S. (1998). Growth performance, intestinal microbial populations and serum cholesterol of broilers diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science.* 77: 1259-1265.

-Koenen M.E. Kramer J. Vanderhulst R. Heres L. Jeuressen S.H.M. and Boersma W.J.A. (2004). Immunomodulation by probiotic *lactobacilli* in layer- and meat-type chickens. *British Poultry Science*. 45: 355 - 366.

-Koohsari H. Ghaemi E. Sheshpoli MS. and Jahedi M. Zahiri M. (2015). The investigation of antibacterial activity of selected native plants from North of Iran. *Journal of medicine and life*. 8 (Spec Iss 2): 38.

-Lewus CB. Kaiser A. and Montville TJ. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (6):1683-8.

-Mahboubi M. and Feizabadi M. (2009). The antimicrobial activity of thyme, sweet marjoram, savory and eucalyptus oils on *Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Aspergillus Niger and Aspergillus flavus*. *Journal of Medicinal Plants.* 2 (30): 137-44.

-Mahmoudi R.Ehsani P.A.Tajik H.Akhoundzadeh B.A. and Khosroshahi A. (2010). Antimicrobial effects of *Mentha longifolia L*. essential oil and *Lactobacillus casei* against *Staphylococcus aureus* in Iranian white cheese. *Journal of food research* (university of Tabriz). 3/20 (1): 147-161.

-Mahmoudi H. Rahnama K. and Arabkhani M. (2010). Antibacterial effect essential oil and extracts of medicinal plant on the causal agents of bacterial canker and leaf spot on the stone fruit tree. *Journal of Medicinal Plants*. 9 (36):34-215.

-Makras L.Triantafyllou V. Fayol-Messaoudi D. Adriany T. Zoumpopoulou G. and Tsakalidou, E. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic *lactobacilli* towards *Salmonella enterica serovar Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*.157 (3): 241-7.

-Mashak Z.Moradi B. (2012). essential oil on the growth of *Bacillus cereus* in a food model system. *Journal of Medicinal Plants*. 2 (42): 62-73.

-Mojab F. Vahidi H. Nickavar B. and Kamali-Nejad M. (2009). Chemical components of essential oil and antimicrobial effects of rhizomes from *Cyperus rotundus L*. *Journal of Medicinal Plants.* 8 (32): 91-186.

Pournazari M. Qotbi A.A.A. Seidavi A.R. and Corazzin M. (2017). Prebiotics, probiotics and thyme *(Thymus vulgaris)* for broilers: performance, carcass traits and blood variables. Revista Colombian*a* de Ciencias Pecuarias. 30 (1): 3-10.

-Rasouli I. Gachkar L. Yadgarinia D. Rezaei M.B. Taghizadeh M. and Fakour M. (2008). Relation of antioxidative property and free radical scavenging capacity to the anti microbial characteristics of essential oils from *mentha spicata L*. and *chenopodium ambrosioides L*. *Iranian Journal Of Medicinal and Aromatic Plants*. 23. Number 4 (38); 492-503.

–Rasooli I. and Rezaei M.B. (2002). Bioactivity and chemical properties of essential oils from *Zataria multiflora Boiss* and *Mentha longifolia L.* Huds. *Journal of Essential Oil Research*. 14 (2): 141-6.

–Reid G. and Burton J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes and infection. 4 (3): 319-24.

- Rolfe R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*. 130: 396S–402S.

–Saavedra J. (2000). Probiotics and infectious diarrhea. *The American journal of gastroenterology*. 9: (1) 5S16-S8.

–Sadeghi E. Dargahi A. Mohamadi A. Asadi F. and Sahraee S.(2015). Antimicrobial effect of essential oils: a systematic review. *Journal of food hygiene*. 5 (2); (18); 1 - 26.

–Sadeghzadeh L. Sefidkon F. and Owlia P. (2006). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Zataria multiflora*. Research Institute of Forests and RangelandsOwlia, P., Owlia, Faculty of Medical science, Shahaed University, Tehran

–Saderi H. Oulia p. and Hashemi S. (2007). The Effect of essential oil of *Matricaria chamomilla L*. on biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal Of Medical Microbiology.*1 (2); 9-14.

–Sanders M.E. (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *The Journal of nutrition*. 130 (2): 384S-90S.

–Servin A.L. (2004). Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews*. 28 (4): 405-40.

–Schwarz S. Silley P.Simjee S. Woodford N.van Duijkeren E. Alan P. and Gaastra J.W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65 (4), 601–604.

-Tabak M. Armon R. Potasman I.. and Neeman I. (1996). In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* by extracts of thyme. *Journal of Applied Bacteriology*. 80 (6): 667-72

-Todorov S. and Dicks L. (2005). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology.* 36 (2): 318-326.

Wade M.R. Manwar S.J. Kuralkar S.V. Waghmare S.P. Ingle V.C. and Hajare S.W. (2018). Effect of thyme essential oil on performance of broiler chicken. *Journal of Entomology and Zoology Studies.* 6 (3): 25-28.

-Youn H.J. and Noh J.W. (2001). Screening of the anticoccidial effects of herb extracts against *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*. 96: 257-263.

-Waldroup P.W.Oviedo-Rondon E.O. and Fritts C.A. (2003). Comparison of Bio-Mos and antibiotic feeding programs in broiler diets containing copper sulphate. *international journal poultry science.* 2: 28–31.