

تأثیر افزودن شیرابه اتانولی گیاه چویل روی رشد باکتری‌های لاکتوباسیلوس و سالمونلا، در محیط شبیه‌سازی شده معده - روده و شیر پس چرخ در شرایط آزمایشگاهی

رضا نقی‌ها*، علی نقی کشتکاران، حمیرا حسینی

گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۸

تاریخ وصول: ۱۳۹۳/۱۱/۱۴

چکیده

زمینه و هدف: برای دستیابی به سلامت بهتر، می‌توان از افزودنی‌هایی در رژیم غذایی انسان استفاده نمود که اثر مناسب روی باکتری‌های مفید و اثر تخریبی روی باکترهای مضر داشته باشند. لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر گیاه چویل بر زنده مانی، افزایش‌سازی و مرگ باکتری‌های لاکتوباسیلوس و سالمونلا در محیط شیر پس چرخ و محیط شبیه‌سازی شده شیر معده و روده بود.

روش بررسی: در این آزمایش تجربی و در دو آزمایش کاملاً تصادفی با سه سطح شیرابه گیاه چویل و چهار باکتری انجام گردید. در آزمایش اول، توانایی شیرابه گیاه چویل در محیط کشت شیر پس چرخ برای بررسی ویژگی‌هایی مانند زنده‌مانی، افزایش‌سازی و مرگ باکتری‌های سودمند و زیان‌بار دستگاه گوارش بررسی شد. در آزمایش دوم با شبیه‌سازی شیر معده و همچنین شیر روده، پیامد شیرابه گیاه چویل روی این باکتری‌ها بررسی گردید. تیمارها دربرگیرنده سه سطح ۰، ۱ و ۳ درصد شیرابه چویل برای سه گونه باکتری پروبیوتیکی و یک گونه باکتری زیان‌بار بودند. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس و آزمون چند دامنه‌ای دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: با افزایش غلظت شیرابه چویل تا سطح ۱ درصد، شمار باکتری‌های پروبیوتیکی نسبت به تیمار شاهد افزایش و باکتری سالمونلا تیفی موریوم در سنجش با تیمار شاهد، کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$). در سطح ۳ درصد، شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم را افزایش داده و سبب کاهش شمار باکتری لاکتوباسیلوس کازئی شده، از رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم جلوگیری کرد. در آزمایش دوم شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم افزایش و شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و سالمونلا تیفی موریوم کاهش یافت. یافته‌های زنده‌مانی باکتری‌ها روی شیر روده ساختگی نشان می‌دهند که تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلاننتاروم و سالمونلا تیفی موریوم وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد گیاه چویل به‌خوبی می‌تواند روی باکتری‌های مفید دستگاه گوارش اثرات سودمندی داشته و باعث افزایش شمار آن‌ها گردد، ولی روی باکتری‌های بیماری‌زا، اثرات تخریبی داشته باشد. به نظر می‌رسد که بتوان از این گیاه در رژیم‌های غذایی و همچنین بیماری‌هایی که باعث ناهمگونی فلور طبیعی دستگاه گوارش می‌شوند، استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: باکتری پروبیوتیکی، چویل، سالمونلا تیفی موریوم، شیر روده‌ی کوچک، شیر معده.

* نویسنده مسئول: رضا نقی‌ها، یاسوج، دانشگاه یاسوج، گروه علوم دامی

Email: Naghiha@yu.ac.ir

مقدمه

وضعیت سبب می‌شود تا شرایط ریز بوم‌شناختی جدیدی در روده پدید آمده و در نتیجه برخی از گونه‌ها به دلیل قدرت اتصال بهتر به دستگاه گوارش و یا سرعت رشد بالاتر، بهتر تکثیر یابند(۴).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده هستند و زمانی که به میزان مناسبی به دستگاه گوارش وارد شوند پیامدهای سودمندی را برای میزبان خود فراهم می‌کنند(۵). گیاه چویل یکی از گیاهان دارویی با ارزش و بومی غرب ایران است که از تیره‌ی چتریان می‌باشد و در کشورهای ترکیه، سوریه، لبنان و عراق پراکنش دارد(۶). رضازاده و همکاران اجزای روغن اسانس سرشاخه‌های هوایی گیاه چویل را بررسی کرده‌اند. در این بررسی سی و سه ترکیب شناسایی شد که ۷۷/۱ درصد آن مونوتروپین و ۱۲/۶ درصد سس‌کویی‌ترین بود(۷).

جعفری و همکاران پیامدهای میکروبی گیاه چویل را مورد بررسی قرار دادند. این بررسی‌های میکروپشناسی به روش دیسک پلیت و بر روی باکتری‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس*^(۱)، *باسیلوس سوبتیلیس*^(۲) و باکتری‌های گرم منفی *اشرشیا کولی*^(۳)، *سالمونلا تیفی‌موریوم*^(۴) و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شیرابه‌های متانولی این گیاه بر تمام

دستگاه گوارش دارای جمعیت بسیاری از میکروب‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا بوده که می‌توانند سبب بروز انواع گوناگونی از بیماری‌های روده‌ای شوند. انسان باید دارای دستگاه گوارش سالم و فعال باشد تا از رشد میکروب‌های بیماری‌زا جلوگیری کند و هضم و جذب به‌شکل مناسب انجام گیرد. حتی کوچکترین آسیب دستگاه گوارش به‌وسیله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ممکن است سبب ایجاد مشکلات گوارشی و به همراه آن بیماری‌های مختلف شوند. باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش به دو دسته سودمند و زیان‌بار گروه‌بندی می‌شوند؛ از جمله مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا می‌توان گونه‌های *سالمونلا*، *کلستریدیوم* و *کمپیلوباکتر* و از گروه باکتری‌های سودمند می‌توان گونه‌های *بیفیدوباکتریوم*، *انتروکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* را نام برد (۱). این باکتری‌ها افزون بر توانایی بالا در تکثیر و ماندگاری در مناطق درونی روده‌ها، با ساخت و انتشار مواد ضد باکتری، از چسبیدن و ماندگاری باکتری‌های بیماری‌زا مانند *سالمونلا* انتریتیدیس در روده جلوگیری می‌کنند (۲). فلور طبیعی دستگاه گوارش شامل دو گروه باکتری می‌باشد، اول باکتری‌هایی که ماندگاری گذرا در لوله گوارش دارند و گروه دوم باکتری‌های درونی، که ماندگاری همیشگی در درون دستگاه گوارش دارند و افزایش می‌یابند (۳). عوامل رژیم‌ی فراوانی می‌توانند ساختار فلور طبیعی روده را تحت تأثیر قرار دهند. همین

1-Salmonella enteritidis
2-Staphylococcus aureus
3-Bacillus subtilis
4-Escherichia coli
5-S. thyphimurium

روش بررسی

این پژوهش در آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه یاسوج در یک آزمایش با طرح کاملاً تصادفی با سه سطح شیرابه‌ی گیاه چویل و چهار گونه باکتری با سه تکرار انجام گردید. این پژوهش در دو آزمایش انجام گرفت. در آزمایش اول، در شرایط آزمایشگاهی توانایی شیرابه گیاه چویل با محیط کشت شیر پس‌چرخ برای بررسی ویژگی‌هایی مانند: زنده ماندن، تکثیر و مرگ باکتری‌های سودمند و زیان‌بار برگزیده شده بومی دستگاه گوارش بررسی شد. در آزمایش دوم با همانندسازی شیرابه معده و روده، پیامد شیرابه گیاه چویل بر زنده ماندن، تکثیر و مرگ باکتری‌های سودمند و زیان‌بار بررسی گردید.

گیاه چویل در فصل بهار از رشته کوه دنا در استان کهگیلویه و بویراحمد گردآوری و در سایه و دمای اتاق خشک و آسیاب (رتسچ^(۳))، آلمان) شد. شیرابه‌گیری اتانولی گیاه چویل در آزمایشگاه شیمی دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد واحد گچساران انجام گردید. میزان ماده خشک شیرابه چویل اندازه‌گیری شد که برابر با ۲۷/۸۳ درصد بود. در این آزمایش از سه گونه باکتری پروبیوتیکی به نام‌های لاکتوباسیلوس کازئی (PTCC:۱۶۰۸)، لاکتوباسیلوس پلانتروم (PTCC:۱۰۵۸) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (PTCC:۱۶۴۳)، هم‌چنین

میکروارگانیزم‌های مورد مطالعه دارای پیامدهای قوی ضد میکروبی است. در یک پژوهش دیگر پیامد اسانس گیاه چویل روی سودوموناس آئروژینوزا^(۱) (عامل اصلی عفونت در سوختگی‌ها) در شرایط درون آزمایشگاهی مورد مطالعه قرارگرفت (۸). پژوهش‌ها روی دانه چویل نشان داده که اسانس دانه دارای خاصیت ضدباکتریایی روی استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز^(۲)، اشرشیا کولی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی موریوم است (۹). تا کنون هیچ گونه بررسی در مورد اثر این گیاه روی باکتری‌های مفید دستگاه گوارش انجام نشده است. از آنجایی که این گیاه در علم سنتی برای نابسامانی‌های فلور دستگاه گوارش استفاده می‌شود، به نظر می‌رسد که توانایی در رفع این نابسامانی، برخاسته از اثرگذاری روی فلور مفید دستگاه گوارش باشد. همچنین با توجه به این که بررسی زنده ماندن این باکتری‌ها در شرایط درون بدنی دشوار و پرهزینه بوده، برای بررسی اولیه بهتر است که نخست اثر این گیاه در شرایط برون بدنی بررسی شود. هدف از این پژوهش بررسی پیامد شیرابه چویل بر سه گونه باکتری پروبیوتیکی و یک گونه باکتری زیان‌بار دستگاه گوارش در شرایط آزمایشگاهی (در مجاورت با ترکیب‌هایی مانند: پپسین، نمک‌های صفراوی، پانکراتین) بود و ویژگی‌هایی مانند زنده ماندن، تکثیر و مرگ باکتری‌های سودمند و زیان‌بار بررسی شد.

1-Pseudomonas aeruginosa
2-Listeria monocytogenes
3- Retsch

از یک گونه باکتری بیماری‌زا *سالمونلا تیفی موریوم* (سویه وحشی) استفاده شد. سه گونه نخست باکتری‌های نام‌برده از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران (کرج) خریداری شدند. در ابتدا بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، در شرایط سترون ویال‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها شکسته شده و پس از افزودن ۵۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی سترون، به محیط‌های کشت اختصاصی خود انتقال داده شدند. پس از اطمینان از یکپارچگی در پرگنه‌ها، یک پرگنه از هر باکتری برداشت شده و برای تکثیر، به محیط کشت مایع اختصاصی انتقال داده شدند. شمارش باکتری‌ها بر اساس تهیه رقت‌های سریالی بر پایه‌ی 10^{-1} و شمارش باکتری‌های زنده بود. این مرحله برای هر چهار باکتری انجام شد، با این تفاوت که به محیط کشت باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بایستی ۰/۰۵ درصد سیستئین هیدروکلرید (مرک، آلمان) یک درصد سترون افزوده می‌شد. محیط کشت جامد باکتری *سالمونلا تیفی موریوم*، آگار مغزی (مرک، آلمان) و سه باکتری دیگر MRS بودند. در پایان پلیت‌های کشت داده شده در گرم‌خانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت، تعداد پرگنه‌های باکتریایی با دستگاه پرگنه‌شمار شمارش و بر پایه‌ی شمار پرگنه در هر پلیت، شمار باکتری در نمونه‌ی نخستین محاسبه گردید.

برای آماده سازی تیمارها، در ابتدا پودر شیر پس‌چرخ (مرک، آلمان) با غلظت ۱/۳ درصد تهیه، با

همزن (GFL، آلمان) همگن و در حمام آب گرم (فن آزما گستر، ایران) در دمای ۷۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سترون گردید (۱۰). در همه لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار ۱۰ میلی‌لیتری، ۷/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت شیر پس‌چرخ ریخته شد و به تیمار یک درصد شیرابه، ۷/۵ میلی‌لیتر شیرابه ۱ درصد؛ تیمار سه درصد شیرابه، ۷/۵ میلی‌لیتر شیرابه سه درصد افزوده شد. در لوله‌های صفر درصد (بدون شیرابه چویل) به جای چویل، ۷/۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون افزوده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر باکتری که دارای $10^9 \times 1/5$ واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر باکتری بود به هر لوله در پیچ‌دار مربوط افزوده گردید که شمار باکتری بر پایه حجم نهایی $10^7 \times 1$ واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر شده است. لوله‌ها به شکل افقی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، لوله‌ها از گرم‌خانه بیرون و برای شمارش باکتری‌ها آماده گردیدند. هم‌چنین pH نمونه‌های آزمایشی اندازه‌گیری گردید.

برای فراهم کردن شیره معده، ۳ گرم پودر پپسین (سیگما، آلمان) و ۱ لیتر محلول نمکی ۰/۵ درصد مخلوط و pH شیره‌ی معده به ۲/۵ رسانیده و سپس با میکروفیلتر سترون شد. برای فراهم کردن شیره روده کوچک، ۳ گرم پودر نمک صفرا (سیگما، آلمان) و ۱ گرم از پودر پانکراتین (سیگما، آلمان) و ۱ لیتر محلول نمکی ۰/۵ درصد مخلوط و pH به ۸ رسانیده شد. سپس با میکروفیلتر سترون و برای

ادامه‌ی پژوهش در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۱). تیمارهای آزمایشی زنده‌مانی باکتری‌ها در برابر شیرهی معده و روده در جدول ۱ ارایه شده است.

برای انجام آزمایش دوم لوله‌های شیرهی معده برای ۲ ساعت و لوله‌های شیرهی روده برای ۴ ساعت در گرم‌خانه، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱). در پایان شمار پرگنه‌های باکتریایی در هر نمونه محاسبه شد. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SAS9.1 و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس و دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

جدول ۲ پیامد تیمارهای آزمایشی بر رشد و نمو باکتری‌ها را نشان می‌دهد. به‌کارگیری شیرابه چویل در سطح ۳ درصد در مقایسه با گروه ۱ درصد چویل، شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم را افزایش داده و سبب کاهش شمار باکتری لاکتوباسیلوس کازئی شده و از رشد باکتری سالمونلا تیفی موریوم جلوگیری کرده و باکتری در این تیمار دیده نشد.

نتایج به دست آمده در مورد اسیدیتیه محیط‌های مورد آزمایش در جدول ۲ ارایه شده است. به‌کارگیری شیرابه چویل در سطح ۱ درصد سبب کاهش میزان اسیدیتیه در سنجش با گروه صفر درصد شده است و کمترین میزان اسیدیتیه برای تیمارهای ۲ و ۸ دیده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که پایداری گونه‌های پروبیوتیکی در آب پنیر در هنگام عبور از

دستگاه گوارش به گونه‌ی باکتری بستگی دارد. در جدول ۳ نتایج حاصل از نقش محافظت‌کنندگی شیرابه چویل از باکتری‌ها در برابر شیرهی معده مشاهده می‌شود. استفاده از ۱ درصد شیرابه چویل در سنجش با صفر درصد شیرابه سبب کاهش شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس کازئی و سالمونلا تیفی موریوم می‌شود.

جدول ۳ نتایج تأثیر تیمارهای آزمایشی بر رشد و زنده‌مانی چهار گونه باکتری را برابر شیرهی روده باریک نشان می‌دهد. در گروه صفر درصد شیرابه‌ی چویل کمترین شمار باکتری برای تیمار ۴ (باکتری لاکتوباسیلوس کازئی) دیده شده است. در گروه ۱ درصد شیرابه نیز کاهش شمار لاکتوباسیلوس کازئی دیده می‌شود. به‌کارگیری ۳ درصد شیرابه نیز سبب کاهش باکتری لاکتوباسیلوس کازئی شده و شمار آن را به صفر می‌رساند.

بحث

از آنجایی که گیاه چویل به عنوان یک گیاه دارویی کاربردهای فراوان و سودمندی برای سلامت انسان دارد، لذا هدف از این مطالعه بررسی اثر گیاه چویل بر زنده‌مانی، افزایش‌ده‌سازی و مرگ باکتری‌های لاکتوباسیلوس و سالمونلا در محیط شیر پس چرخ و محیط شبیه‌سازی شده شیرهی معده و روده بود.

جدول ۱: اثر تیمارهای آزمایشی بر میانگین شمار باکتری‌های مورد مطالعه

تیمارهای آزمایشی	گروه بندی‌ها	میانگین شمار باکتری‌ها
۱ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۰	۴/۸۵ ± ۰/۴۵ ^f
۲ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۱	۱۰/۲۱ ± ۰/۱۵ ^{abc}
۳ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۳	۱۰/۸۵ ± ۰/۰۰۹ ^a
۴ لاکتوباسیلوس کازئی	۰	۵/۵ ± ۰/۱۶ ^f
۵ لاکتوباسیلوس کازئی	۱	۹/۸۹ ± ۰/۲۳ ^{bcd}
۶ لاکتوباسیلوس کازئی	۳	۸/۷۱ ± ۰/۱۸ ^e
۷ لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۰	۵/۳۲ ± ۰/۱۳ ^f
۸ لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱	۹/۴۹ ± ۱/۱۰ ^d
۹ لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۳	۱۰/۷۵ ± ۰/۴۸ ^a
۱۰ سالمونلا تیفی موریوم	۰	۱۰/۳۳ ± ۰/۱۸ ^{ab}
۱۱ سالمونلا تیفی موریوم	۱	۹/۵۱ ± ۰/۰۹ ^{dc}
۱۲ سالمونلا تیفی موریوم	۳	. ^g
		±SEM
		۰/۲۲

میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p < ۰/۰۵).

جدول ۲: میانگین میزان pH (پس از گرم‌خانه گذاری) در تیمارهای آزمایشی

تیمارهای آزمایشی	pH
۱ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۰ درصد شیرابه	۵/۲۶ ± ۰/۵۱
۲ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۱ درصد شیرابه	۴/۱۷ ± ۰/۰۱
۳ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و ۳ درصد شیرابه	۴/۰۴ ± ۰/۰۴
۴ لاکتوباسیلوس کازئی و ۰ درصد شیرابه	۵/۵۶ ± ۰/۱۰
۵ لاکتوباسیلوس کازئی و ۱ درصد شیرابه	۴/۸۱ ± ۰/۰۱
۶ لاکتوباسیلوس کازئی و ۳ درصد شیرابه	۵/۰۱ ± ۰/۰۲
۷ لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ۰ درصد شیرابه	۵/۳۵ ± ۰/۳۲
۸ لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ۱ درصد شیرابه	۴/۳۶ ± ۰/۰۳
۹ لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ۳ درصد شیرابه	۴/۳۴ ± ۰/۰۲
۱۰ سالمونلا تیفی موریوم و ۰ درصد شیرابه	۶/۳ ± ۰/۰۴ ^a
۱۱ سالمونلا تیفی موریوم و ۱ درصد شیرابه	۵/۵۷ ± ۰/۰۷
۱۲ سالمونلا تیفی موریوم و ۳ درصد شیرابه	۵/۴۹ ± ۰/۰۲
±SEM	
۰/۱۰۴	

میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد

(p < ۰/۰۵).

جدول ۳: میانگین زنده‌مانی باکتری‌ها در برابر شیرهی معده و

روده		
میانگین شمار باکتری‌ها	میانگین شمار باکتری‌ها	تیمارهای آزمایشی
۷/۳۱ ± ۰/۰۷ ^a	۷/۵۹ ± ۰/۰۱ ^{ab}	۱ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۰ درصد شیرابه
۶/۹۴ ± ۰/۰۲ ^a	۷/۶۵ ± ۰/۰۱ ^a	۲ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱ درصد شیرابه
۷/۰۹ ± ۰/۰۵ ^a	۷/۸۶ ± ۰/۰۱ ^a	۳ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۳ درصد شیرابه
۴/۹ ± ۰/۲۳ ^b	۶/۹۷ ± ۰/۰۲ ^d	۴ لاکتوباسیلوس کازئی ۰ درصد شیرابه
۱/۶ ± ۱/۰۷ ^c	۶/۶۷ ± ۰/۰۲ ^e	۵ لاکتوباسیلوس کازئی ۱ درصد شیرابه
. ^d	۶/۴۰ ± ۰/۰۳ ^{ef}	۶ لاکتوباسیلوس کازئی ۳ درصد شیرابه
۷/۲۴ ± ۰/۰۶ ^a	۷/۱۲ ± ۰/۰۲ ^{dc}	۷ لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۰ درصد شیرابه
۷/۲۴ ± ۰/۲۶ ^a	۷/۱۸ ± ۰/۰۱ ^{dc}	۸ لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱ درصد شیرابه
۷/۳۲ ± ۰/۰۴ ^a	۷/۳۲ ± ۰/۰۱ ^{bc}	۹ لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۳ درصد شیرابه
۷/۰۶ ± ۰/۲۵ ^a	۷/۰۹ ± ۰/۰۵ ^{dc}	۱۰ سالمونلا تیفی موریوم ۰ درصد شیرابه
۶/۸۲ ± ۰/۱۳ ^a	۶/۴۷ ± ۰/۰۱ ^{ef}	۱۱ سالمونلا تیفی موریوم ۱ درصد شیرابه
۶/۱۸ ± ۰/۰۰۵ ^a	۶/۲۵ ± ۰/۰۴ ^f	۱۲ سالمونلا تیفی موریوم ۳ درصد شیرابه
-/۰۲۱	۰/۰۹۸	±SEM

میانگین‌ها با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنادار می‌باشد (P<۰/۰۵).

لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها می‌شود. دلئوناردیس و همکاران (۱۳) مشاهده کردند که افزودن شیرابه برگ زیتون به شیر سبب افزایش کیفیت و ارزش غذایی شیر می‌شود بدون این‌که هیچ‌گونه پیامد منفی روی باکتری‌های اسید لاکتیکی بگذارد. سازوکار افزایش شمار باکتری‌های پروبیوتیک از راه شیرابه-های دارای ترکیبات فنلی هنوز شناخته نشده است.

در این پژوهش، به‌کارگیری شیرابه‌ی چویل در سطح ۳ درصد در مقایسه با گروه ۱ درصد چویل، شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم را افزایش داده و سبب کاهش شمار باکتری لاکتوباسیلوس کازئی شده است. مولان و همکاران (۱۲) گزارش کردند که افزودن شیرابه چای سبز سبب افزایش معنی‌داری در شمار

گیاه چویل دارای ترکیبات فنلی مانند کارواکرول، تیمول، ائوجنول و کومارین است، بنابراین گمان می‌رود که افزایش شمار لاکتوباسیل‌ها در پژوهش کنونی نیز به دلیل وجود همین ترکیب‌های فنلی در شیرابه چویل باشد. سای گزارش کرد که کارواکرول دارای دو ویژگی جلوگیری از رشد باکتری و باکتری‌کشی برای شمار زیادی از گونه‌های باکتریایی مانند *سالمونلا تیفی و ریوم*، *اشرشیا کولی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است. پیامدهای دوگانه موجود در شیرابه چویل بر باکتری‌های لاکتوباسیل (گرم مثبت) و باکتری *سالمونلا تیفی*-موریوم (گرم منفی) می‌تواند برآمده از تفاوت دیواره برون یاخته‌ای آن‌ها باشد. گمان می‌رود که تفاوت دیواره در میان این دو گروه از باکتری‌ها سبب پیامد افزایش چویل بر باکتری‌های گرم مثبت مانند لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس*، لاکتوباسیلوس *کازئی* و لاکتوباسیلوس *پلانتاروم* و کاهش چویل بر باکتری گرم منفی مانند *سالمونلا تیفی* موریوم باشد (۱۴).

کارواکرول از راه تخریب غشای سلولی و تأثیر بر هموستازی pH درون سلولی و برهم خوردن تعادل یون‌های غیر آلی از تکثیر سلولی جلوگیری کرده و سبب مرگ باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود. استفاده از ۱ درصد شیرابه چویل در سنجش با صفر درصد شیرابه سبب کاهش شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس *کازئی* و *سالمونلا تیفی* موریوم می‌شود. یک فاکتور مهم مؤثر بر زنده‌مانی گونه‌های باکتری‌های پروبیوتیکی در غذاها pH است. مادوریرا

و همکاران (۱۵) در پژوهشی که زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیکی در آب پنیر را در دستگاه گوارش بررسی می‌کردند، نشان دادند که باکتری لاکتوباسیلوس *پاراکازئی* و *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* بالاترین نرخ مرگ و میر را در شیره معده و همچنین در برابر نمک صفرا دارند و بیشترین زنده‌مانی برای باکتری لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* مشاهده شد. هلند و همکاران (۱۶) در پژوهشی که اثر شیرابه‌های مالت، گندم و جو را بر زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس *اسیدوفیلوس* و لاکتوباسیلوس *پلانتاروم* و لاکتوباسیلوس *روتیری* برای ۴ ساعت در یک بافر فسفات اسیدی شده با pH برابر ۲/۵ بررسی کردند به این نتیجه رسیدند که افزودن شیرابه غلات بر تحمل اسیدیته هر سه گونه مؤثر بوده و زنده‌مانی را بهبود بخشیده است.

در پژوهش حاضر، به‌کارگیری ۳ درصد شیرابه نیز سبب کاهش باکتری لاکتوباسیلوس *کازئی* شده و شمار آن را به صفر می‌رساند. فاکتورهای اساسی مؤثر بر زنده‌مانی باکتری‌ها در دستگاه گوارش، pH در شرایط اسیدی معده و نمک صفرا در روده است (۱۷). همچنین مادوریرا و همکاران (۱۵) بیان کردند که درجه اسیدیته معده و زمان قرارگرفتن باکتری‌ها در شرایط اسیدی و همچنین غلظت نمک صفرا و زمان قرار گرفتن باکتری در برابر نمک صفرا در شرایط همانندسازی روده زنده‌مانی گونه‌های پروبیوتیکی را در دستگاه گوارش تعیین می‌کند. ایشان گزارش کردند که گونه‌های باکتریایی در شیره

معدۀ نسبت به شیرۀ روده باریک پایدارتر هستند. ایشان نشان دادند که باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به غلظت‌های مختلف نمک صفرا (۱، ۵/۰ و ۳/۰ درصد) خیلی حساس است و پس از ۳۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری این باکتری در شیرۀ روده هیچ سلول زنده‌ای مشاهده نشد. همچنین برای باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس شمار باکتری‌های زنده کاهش یافت، ولی در غلظت‌های پایین نمک صفرا امکان زنده‌مانی بیشتر است. در پژوهش کنونی با توجه به معنی‌دار نبودن تفاوت میانگین‌ها برای زنده‌مانی باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم در شیرۀ روده کوچک گمان می‌رود که توانایی زنده‌مانی این باکتری‌ها تحت تأثیر pH شیرۀ همانندسازی شده روده که برابر ۸ است و همچنین نمک صفرا قرار می‌گیرد. از آن‌جا که این باکتری‌های لاکتیک اسیدی در شرایط اسیدی بهتر از شرایط قلیایی رشد می‌کنند افزایش pH تا ۸ سبب کاهش زنده‌مانی و رشد شده است و شیرابه چویل بر زنده‌مانی لاکتوباسیل‌ها تأثیری ندارد. همچنین گمان بر این است که کاهش زنده‌مانی لاکتوباسیلوس کازئی در شیرۀ روده باریک به دلیل افزایش pH و وجود نمک صفرا است. می‌توان گفت که با افزایش حساسیت لاکتوباسیلوس کازئی در برابر نمک صفرا و افزایش pH حساسیت این باکتری در برابر شیرابه چویل نیز افزایش یافته و شمار این باکتری کاهش می‌یابد. کاهش شمار لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و

لاکتوباسیلوس پلانتروم به دلیل حساسیت بالای لاکتوباسیلوس کازئی به نمک صفرا و تفاوت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی بین این باکتری‌ها مربوط است. پیشنهاد می‌شود که از شیرابه‌های متانولی و آبی این گیاه در غلظت‌های متفاوت پروبیوتیکی استفاده شده و در بازه‌های زمانی و دمایی مختلف، رشد پروبیوتیک‌های دیگر بررسی شوند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد گیاه چویل به خوبی می‌تواند روی باکتری‌های مفید و مهم دستگاه گوارش اثرات سودمندی داشته و باعث افزایش شمار آن‌ها گردد، ولی روی باکتری‌های بیماری‌زا، اثرات تخریبی داشته باشد. شاید بتوان از این گیاه در رژیم‌های غذایی و همچنین بیماری‌هایی که باعث ناهمگونی فلور طبیعی دستگاه گوارش می‌شوند، استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح پژوهشی مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه یاسوج بود که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.

REFERENCE

1. Barnes EM, Phil D, Bact D. The avian intestinal flora with particular reference to the possible ecological significance of the cecal anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* 1972; 25: 1475-9.
2. Jin LZ, Ho YW, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology* 1996; 27: 183-5.
3. Vila B., Esteve-Garcia, E., and Brufau, J. "Probiotic micro organisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action". *World's Poultry Science Journal*, 2010; 65:369-380.
4. Gaggia F, Mattarelli P, Biavati B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 2010; 141: 15-28.
5. Espinoza YR, Navarro YG. Non-dairy probiotic products. *Food Microbiology* 2008; 27; 1-41.
6. Mozafarian V. Encyclopedia of Iranian plants name, 1388, Farhang moaser, 740 (Article in Persian)
7. Rezazadeh Sh, Yazdani D, Shahbazi S. Detection of effective compounds of *Ferulago angulata* collected in west of Iran. *Journal of Medical Plants*, 1996; 7: 35-8.
8. Jafari A, Javidnia K, Talebi F. Antibacterial effects of *ferulago* (Schelecht) Boiss, subsp. *angulata*. *Second Congress of Medical Plants* 1391, 187.
9. Taran M, Ghasem pour HR, Shirin Pour E. Antimicrobial activity of essential oils of *Ferulago angulata* sub sp. *Carduochorum*. *Jundishapur Journal of Microbiology* 2010; 3 (1): 10-4.
10. Haddadin MSY. Effect of olive leaf extracts on the growth and metabolism of two probiotic bacteria of intestinal origin. *Pakistan Journal of Nutrition* 2010; 9(8): 787-93.
11. Kos B, Suskovic J, Goreta J, Matosic S. Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology* 2000; 38: 121-7.
12. Molan AL, Flanagan J, Wei W, Moughan PJ. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chemical* 2009; 114: 820-35.
13. De Leonardis A, Acetini A, Alfano G, Macciola V, Ranalli G. Isolation of a hydroxytyrosol rich extract from olive leaves (*Olea Europaea* L.) and evaluation of its antioxidant properties and Bioactivity. *Food Research Technology* 2008; 226: 653-9.
14. Si W. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 2006; 100(2): 296-305.
15. Madureira AR, Pereira CI, Truzkowska K, Gomes AM, Pintado ME, Malcata FX. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. *International Dairy Journal* 2005; 15: 921-7.
16. Helland MH, Wicklund T, Narvhus JA. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 91: 305-13.
17. Pacheco KC, Valencia del toro G, Martínez FR, Duran-Paramo E. Viability of *Lactobacillus delbrueckii* under human gastrointestinal conditions simulated in vitro. *American Journal of Agriculture and Biotechnology Science* 2010; 5: 37-42.

Effects of Ethanolic *Chavill* Extract on Growth of *lactobacillus* and *salmonella* Bacteria Skimmed Milk and Imaging Gastric- Intestine Media *in Vitro*

Naghiha R*, Keshtkaran AN, Hosseini H

Department of Animal Sciences, Yasuj University, Yasuj, Iran

Received: 3 Feb 2015

Accepted: 29 June 2015

Abstract

Introduction & aim: To achieve high performance and health, it's better to use additives in the human diet which have beneficial effects on good bacteria and damaging effect on the harmful bacteria. For this purpose, effects of *Chavill* extract on growth, viability and death of *lactobacillus* and *salmonella*, in skimmed milk and imaging gastric-intestine media were studied *in vitro* conditions.

Methods: This study was investigated in two completely randomized experiments with three levels of *Chavill* extract. In the first experiment, ability of the *Chavill* extract in Skim Milk medium was examined to survey survival, proliferation and death of beneficial and pathogenic gut bacteria. The second experiment which was down in the simulation of simulated gastric juice and simulated small intestine juice, the effect of *Chavill* extract on survival, proliferation and death of the bacteria were investigated. Treatments in both of experiments were three levels of *Chavill* extract (0, 1, and 3 %) for three probiotic bacteria species. Data were analyzed with SAS 9.1 software and their means were compared by Duncan's Multiple Range test at a significance level of 5 %.

Results: By increasing of *Chavill* extract concentration to 1%, probiotic bacterial counts significantly increase compared to control treatment and the differences were significant and the count of *Salmonella typhimurium* difference with control significantly decreased. Using 3% *Chavill* extract compared to 1% extract, increased number of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*, decreased number of *Lactobacillus casei*, inhibit growth of *Salmonella typhimurium* bacterium and block growth of this bacterium. The second experiment on simulated gastric juice showed that numbers of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* bacteria increased and *Lactobacillus casei* and *Salmonella typhimurium* decreased. Also, findings of bacterial survival on simulated small intestine juice showed that there was no significant difference in bacterial on *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum*.

Conclusion: Results showed that *Chavill* have good effects on binifical bacteria of digestive system and increases the number of beneficial bacteria and have harmful effects on pathogenic bacteria. It seemed that this plant could be used in diets and also for diseases causing imbalances of normal flora in the gastrointestinal tract.

Keywords: Probiotic bacteria, *Chavill*, *Salmonella typhimurium*, gastric juice, small intestine juice.

Corresponding Author: Naghiha A, Departmnt of Animal science, Yasuj University, Yasuj, Iran

Email: Naghiha@yu.ac.ir

Please cite this article as follows:

Naghiha R, Keshtkaran AN, Hosseini H. Effects of Ethanolic *Chavill* Extract on Growth of *lactobacillus* and *salmonella* Bacteria Skimmed Milk and Imaging Gastric-Intestine Media *in Vitro*. *Armaghane-danesh* 2015; 20 (5): 393-403.