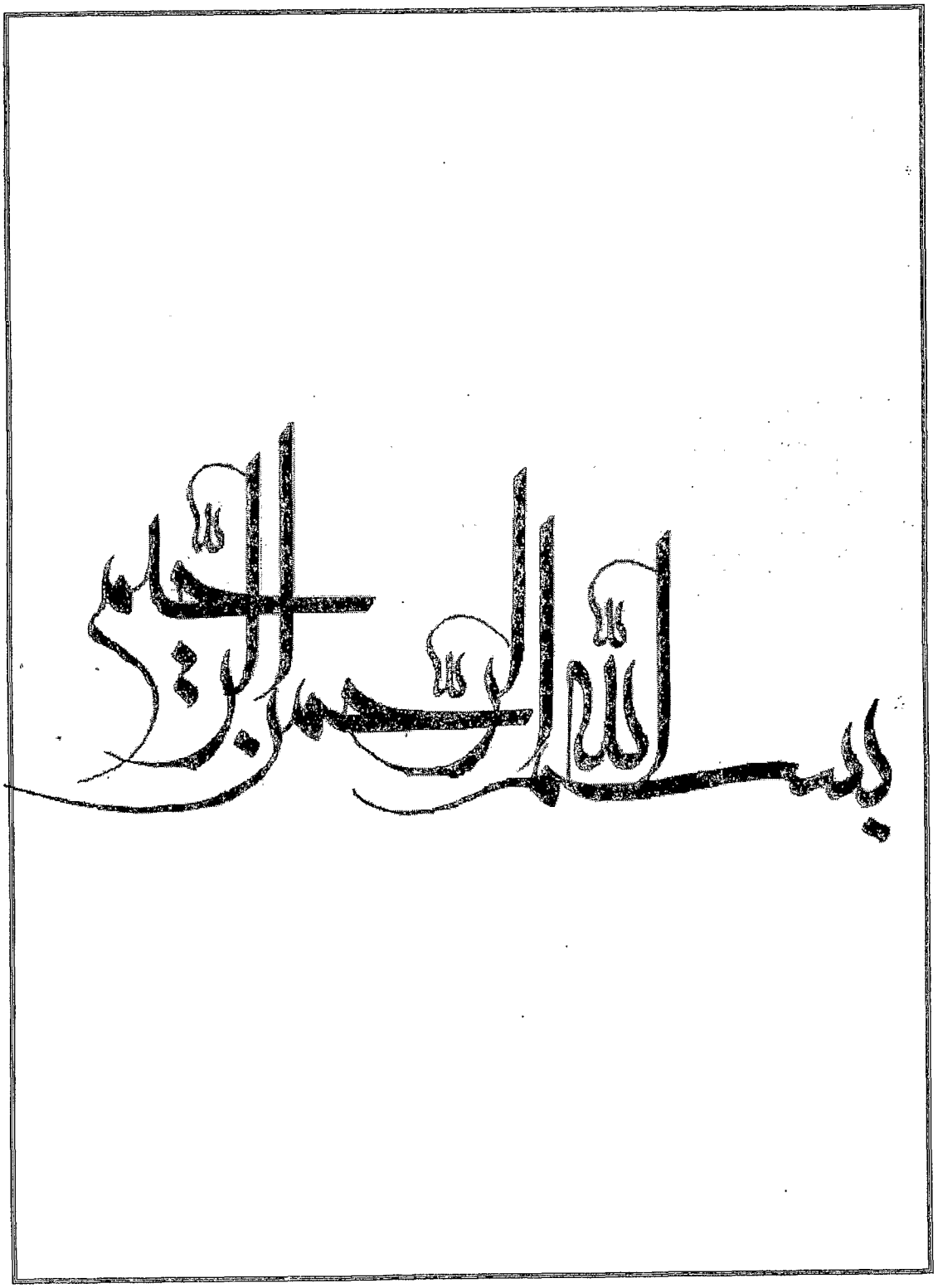

١٠٢٥٧

دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم زیستی

پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی

عنوان

بررسی پتانسیل پروبیوتیکی محصولات لبنی سنتی (با تاکید بر ماست و پنیر) شهرستان کلیبر واقع در استان آذربایجان شرقی

اساتید راهنما

آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور　　آقای دکتر محمد امین حجازی

دانشجو

صولت اسلامی

بهمن ۱۳۸۶

۱۳۸۶/۱۲/۲۷

۱۰۲۵۵۷

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

« صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

تهران ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
تلفن: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع ۲۰۰/۳۲۹۸/ت/د مورخ ۸۶/۱۰/۱۰ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه صولت اسلامی به شماره شناسنامه ۲۹۱ صادره از اهر متولد ۱۳۵۹ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

با عنوان :

بررسی خصوصیات پروبیوتیک محصولات لبنی سنتی (با تاکید بر ماست و پنیر) شهرستان کلیبر آذربایجان شرقی

به راهنمائی:

آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور
آقای دکتر محمد امین حجازی

۱۳۸۶/۱۲/۲۷

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۶/۱۱/۱۳ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

۲- استاد راهنما : آقای دکتر محمد امین حجازی

۳- استاد داور : آقای دکتر جمشید فولادی

۴- استاد داورونماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر حسین ریاحی

تقدیم به

خدای بی نیازم

پدر و مادر مهربانم

خواهران دلسوزم

برادران همراهم

سپاسگذاری

حمد و سپاس خدای متعال را که توفیق انجام این پژوهش را عطا فرمود. بر خود واجب می دانم، از کلیه کسانی که مرا در انجام این تحقیق یاری نمودند، سپاسگذاری نمایم.

در ابتدا از جناب آقای دکتر دکتر غلامحسین ابراهیمی پور و جناب آقای محمدامین حجازی که همواره در انجام این تحقیق چه از باب راهنمایی و چه از باب مشاوره، بارکاستی های اینجانب رابدوش می کشیدند، صمیمانه تشکر می نمایم.

از حضور همیشگی خانواده ای خوب در تمام مراحل تحصیلی ام خدارا شاکرم و به خاطر تمام تلاشهایشان کمال تشکر رادارم.

از جناب آقای مهندس ابوالفضل برزگری و جناب آقای مهندس شهرام خسروی که همواره در انجام این تحقیق مرایاری نمودند، صمیمانه تشکر می نمایم.

از جناب آقای دکتر نمازی و همسر محترمشان سرکار خانم مهندس رادبه دلیل همکاریهای صمیمانه و ارزشمندشان کمال تشکر رادارم.

از همکاری صمیمانه و بی دریغ سرکار خانم دکتر ابراهیمی آبادی، جناب آقای مهندس بیوک رئیسی و آقای دکتر علیرضا دهناد کمال تشکر رادارم.

از همکلاسی خوب و عزیزم جناب آقای محمد یعقوبی که همواره اینجانب رایاری فرموده اند، صمیمانه سپاسگذارم.

از همکاری محققان پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور خانم ها مظلومی، پورجبار، حسین زاده، جعفریان و زرشکی و آقایان مهرپویا، خوشروی، اعتمادی، بخشی، سالک جلالی و عباسعلیزاده کمال تشکر را دارم.

از کارکنان محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور آقایان محرمی، میرزایی، ابهری، زرشناس، زارعی، طباطبائی و ساقی به جهت مساعدت های ایشان در انجام این پایان نامه سپاسگزارم.

صولت اسلامی

چکیده

بشر در طول سالیان متمادی زندگی با بیماریهای مختلفی روبرو شده است. با پیدایش علوم پزشکی و افزایش دانسته های بشری، بسیاری از این بیماریها درمان شده و در عصر جدید انسان به دنبال رفاه، آسایش و افزایش کمی و کیفی زندگی می باشد. یکی از مهمترین راههایی که انسان می تواند به این اهداف نائل شود، استفاده از پروبیوتیک هاست. مفهوم پروبیوتیک از کارهای میچنکوف در سال ۱۹۰۸ ناشی شده است؛ او معتقد بود که افزایش طول عمر دهقانان بالکان به خاطر مصرف شیر تخمیر شده حاوی نوعی لاکتوباسیلوس مرتبط با ماست می باشد. امروزه، پروبیوتیک ها به میکروارگانیسم های زنده ای اطلاق می شود که با تحت تاثیر قرار دادن ترکیب و/ یا فعالیت متابولیکی فلور دستگاه گوارشی تاثیر سودمندی روی میزبان می گذارد.

محصولات لبنی سنتی با دارا بودن بار میکروبی بالا و معمولاً GRAS منابع خوبی را برای جداسازی میکروارگانیسم های پروبیوتیک فراهم ساخته است. همچنین، با توجه به اهمیت روزافزون محصولات لبنی در رژیم غذایی، می توان از این محصولات به عنوان ابزارهایی برای انتقال میکروارگانیسم های پروبیوتیک به صورت کشت های خالص، به دستگاه گوارشی استفاده کرد تا علاوه بر داشتن نقش مغذی، سایر خصوصیات بیولوژیکی سودمند پروبیوتیکی را هم فراهم سازد.

در این تحقیق پتانسیل پروبیوتیکی محصولات لبنی سنتی ماست و پنیر شهرستان کلیبر با جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم هایی با پتانسیل پروبیوتیکی بررسی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که پنیر و ماست محلی شهرستان کلیبر، درست شده به روشهای خانگی از نظر دارا بودن میکروارگانیسم هایی با پتانسیل پروبیوتیکی ارزشمند است، بطوریکه میکروارگانیسم های جداسازی شده در این تحقیق که متعلق به دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکسی بودند، مقاومت بالایی را به شرایط سخت فیزیولوژیکی موجود در دستگاه گوارشی، ایجاد شده در سیستم های *in vitro* نشان دادند (شرایط اسیدی معده و نمک های صفراوی موجود در دوازدهه و روده کوچک). ایزوله های لاکتوباسیلوسی از طریق روشهای فنوتیپیکی شناسایی و در درون گونه های لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس

کازئی، لاکتوباسیلوس دایورژنس، و لاکتوباسیلوس فرمنتوم و/ یا برویس و/ یا ریوتری قرار گرفتند. برای شناسایی دقیق ایزوله های انتروکوکسی علاوه بر روش فنوتیپیکی از ترکیب ۳ روش مولکولی RAPD، RFLP-16S rDNA و تعیین توالی ژنهای ۱۶S rDNA تکثیر یافته با آغازگرهای طراحی شده، استفاده شد. نتایج شناسایی ایزوله های انتروکوکسی جداسازی شده نشان داد که این ایزوله ها، متعلق به گونه های انتروکوکسی فاشیوم، انتروکوکسی فکالیس و انتروکوکسی دورانس می باشد. ایزوله های مربوط به انتروکوکسی فاشیوم دارای پتانسیل پروبیوتیکی بالا و فراوانی بیشتری بودند. همچنین، به دلیل اهمیت جنبه ایمنی میکروارگانیسم های استفاده شده به عنوان پروبیوتیک و به خصوص سویه های انتروکوکسیایی (به خاطر داشتن ژنهای کد کننده مقاومت های آنتی بیوتیکی و ژنهای مرتبط با فاکتورهای ویرولانس) حساسیت فنوتیپی ایزوله های انتروکوکسی جداسازی شده در این تحقیق به ۱۰ آنتی بیوتیک مهم بالنی تعیین گردید. نتایج حاصل از تستهای آنتی بیوگرام نشان دادند که ایزوله های انتروکوکسیایی جداسازی شده در این تحقیق از نظر فنوتیپی به آنتی بیوتیک های مهم بالینی تست شده در این آزمایش حساس و برای تعیین دقیق مقاومت به آنتی بیوتیک ها، روش های مولکولی پیشنهاد می شود.

عنوان

صفحه

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و کلیات ۱

۱-۱- مقدمه ۲

۱-۲- تاریخچه ۳

۱-۳- مفهوم و تکامل واژه پروبیوتیک: ۵

۱-۴- اکولوژی میکروبی روده: ۷

۱-۴-۱- دستگاه گوارشی به عنوان یک اکوسیستم: ۷

۱-۴-۲- میکروبیوتای دستگاه گوارشی انسان : ۸

۱-۴-۳- نقش و عملکرد باکتریهای همزیست در مدیریت میکروبیوتای دستگاه گوارشی ۹

۱-۵- میکروارگانیسم های پروبیوتیک ۱۰

۱-۵-۱- مثالهایی از میکروارگانیسمهای پروبیوتیک ۱۰

۱-۵-۲- انتخاب سویه های میکروبی ۱۲

۱-۶- پریبیوتیکها ۱۵

۱-۷- سینبیوتیک ۱۹

۱-۸- تحلیل اثرات پروبیوتیکها: ۲۰

۱-۸-۱- روشها و سیستم های in vitro ۲۰

۱-۸-۱-۱- انتخاب سویه هایی با پتانسیل پروبیوتیکی ۲۰

۱-۸-۱-۱-۱- تحمل به اسید و نمکهای صفراوی ۲۰

۱-۸-۱-۱-۲- مدلهای in vitro چسبندگی ۲۱

۱-۸-۱-۱-۳ - آزمونهای in vitro بر علیه باکتریهای بیماریزا ۲۱

۱-۸-۱-۱-۴- ایمنواسی یا تستهای ایمنی ۲۲

۱-۸-۱-۱-۵- آزمونهای ایمنی ۲۲

۱-۸-۱-۲- راکتورهای مدل روده ای ۲۳

۱-۸-۲- آزمون های حیوانی ۲۴

۱-۸-۳- آزمون های انسانی ۲۵

۱-۹- فواید و پتانسیل استفاده از پروبیوتیک ها ۲۶

۱-۹-۱- اثرات سودمند تثبیت شده در مطالعات انسانی ۲۶

۱-۹-۱-۱- اسهال ۲۶

۱-۹-۱-۲- تحریک سیستم ایمنی ۲۷

۱-۹-۱-۳- بیماری التهابی روده ۲۷

۱-۹-۱-۴- سندرم روده تحریک پذیر ۲۸

۱-۹-۱-۵- عدم تحمل لاکتوز ۲۸

عنوان | صفحه

۱-۹-۱-۶- حساسیت ها ۲۸
۱-۹-۱-۷- سرطان ۲۹
۱-۹-۱-۸- عفونت های دستگاه تنفسی ۳۰
۱-۹-۱-۹- یبوست ۳۰
۱-۹-۱-۱۰- عفونت های دستگاه ادراری- تناسلی ۳۰
۱-۹-۱-۱۱- عفونت هلیکوباکتر پیلوری ۳۱
۱-۹-۱-۱۲- کلسترول بالا ۳۱
۱-۱۰ - تکنولوژی پروبیوتیکها ۳۲
۱-۱۰-۱- کاربرد کشتهای پروبیوتیک در محصولات غذایی ۳۲
۱-۱۰-۱-۱- محصولات لبنی ۳۳
۱-۱۰-۱-۲- محصولات غذایی دیگر ۳۳
۱-۱۰-۱-۳- مکمل های غذایی و محصولات خارج از بورس فروخته شده ۳۴
۱-۱۱- مکانیسم عمل پروبیوتیکها ۳۵
۱-۱۱-۱- اثرات بیوشیمیایی ۳۵
۱-۱۱-۲- رقابت برای مواد غذایی ۳۸
۱-۱۱-۳- واریزی یا تصفیه ایمنی ۳۸
۱-۱۱-۴- اتصال ۳۹
۱-۱۲- مروری بر دو جنس مورد مطالعهٔ لاکتوباسیلوس و انتروکوکسی ۳۹
۱-۱۲-۱- جنس لاکتوباسیلوس در یک دیدگاه کلی ۴۰
۱-۱۲-۱-۱- امنیت زیستی لاکتوباسیلوس های پروبیوتیک ۴۱
۱-۱۲-۱-۱-۱- فعالیت متابولیکی ۴۱
۱-۱۲-۱-۱-۲- عفونت هایی مرتبط با لاکتوباسیلوس های پروبیوتیک ۴۴
۱-۱۲-۱-۱-۳- واکنش های ژنتیکی میان لاکتوباسیلی پروبیوتیک و میکروب های روده ای ۴۵
۱-۱۲-۱-۱-۴- عملکرد ایمن ۴۷
۱-۱۲-۱-۲- مشخصات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس ۴۹
۱-۱۲-۱-۳- باکتریوسین های تولید شده بوسیلهٔ لاکتوباسیلوس ۵۲
۱-۱۲-۱-۴- استفادهٔ باکتریوسین های لاکتوباسیلی در نگهداری غذا ۵۴
۱-۱۲-۲- مروری عمومی بر انتروکوکسی ۵۶
۱-۱۲-۲-۱- اکولوژی، تاکسونومی، و فیزیولوژی انتروکوکسی ۵۹
۱۱-۱۲-۲- ۲- کاربرد انتروکوکسی در غذاها ۶۰
۱-۱۲-۲-۱- کاربرد انتروکوکسی در محصولات لبنی ۶۰
۱-۱۲-۲-۲- ۲- کاربرد انتروکوکسی در محصولات گوشتی ۶۱
۱۱-۱۲-۲-۳- کاربرد انتروکوکسی در دستگاه گوارشی ۶۲

عنوان | صفحه

۱-۱۲-۲-۳-۱ عملکرد روده و فلور نرمال ۶۲

۱-۱۲-۲-۳-۲- انتروکوکسی به عنوان پروبیوتیک: شانس ها و چالش ها ۶۳

۱-۱۲-۲-۴- پنیرهای محلی خانگی به عنوان منابعی برای جداسازی سویه های پروبیوتیک انتروکوکوس فاشیوم ۶۵

۱=۱۳= اهداف تحقیق ۶۷

فصل ۲: مواد و روشها ۷۰

۲-۱- وسایل مورد استفاده ۷۱

۲-۲- مواد مورد استفاده ۷۲

۲-۲-۱- نمونه های مورد آزمایش ۷۲

۲-۲-۲- مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق ۷۲

۲-۲-۳- محیط های کشت ۷۴

۲-۲-۳-۱- محیط های کشت مصرفی ۷۴

۲-۲-۳-۲- محیط کشت ساختگی ۷۴

۲-۳- روش‌های تحقیقی استفاده شده ۷۵

۲-۴- نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده در این تحقیق ۷۶

۲-۵- نمونه برداری ۷۷

۲-۶- تهیهٔ سوسپانسیون باکتریایی و کشت اولیه ۷۷

۲-۷- غربال جمعیت باکتریایی اولیه و انتخاب ایزوله های مقاوم به اسید ۷۸

۲-۸- تعیین درصد بقاء ایزوله های جداسازی شده در شرایط اسیدی معادل با شرایط اسیدی معده ۷۹

۲-۹- تعیین مقاومت به نمک های صفراوی برای سویه هایی با تحمل بالای شرایط اسیدی ۸۱

۲-۱۰- شناسایی فنوتیپیکی ایزوله های دارای پتانسیل پروبیوتیکی ۸۱

۲-۱۱- تعیین فنوتیپی حساسیت ایزوله های انتروکوکسی به آنتی بیوتیک های مهم ۸۲

۲-۱۲- شناسایی مولکولی سویه های ایزوله شدهٔ انتروکوکسی و مقایسهٔ آنها با سویه های استاندارد ۸۴

۲-۱۲-۱- استخراج DNA ۸۴

۲-۱۲-۲- طراحی آغازگر های اختصاصی برای تکثیر ۱۶ S rDNA انتروکوکسی های ایزوله شده ۸۵

۲-۱۲- ۳- انجام واکنش زنجیره ای پلی مراز و تکثیر قطعه ۱۶ S rDNA ۸۶

۲-۱۲-۴- تفکیک قطعات تکثیر یافته ۸۷

۲-۱۲-۵-خالص سازی محصول PCR ۸۸

۲-۱۲-۶- هضم آنزیمی قطعات ۱۶S rDNA با آنزیم های برشی و مقایسهٔ بیوانفورماتیکی آنها ۸۸

۲-۱۲-۷- بررسی تنوع ژنتیکی باکتریهای جداسازی شده در سطح ژنومی با استفاده از تکنیک RAPD ۸۹

۲-۱۲-۸- ارسال نمونه ها برای انجام توالی یابی ۹۰

عنوان | صفحه

فصل ۳: نتایج و بحث ۹۱

۳-۱ نتایج ۹۲

۳-۱-۱- غربال سازی سویه های مقاوم به اسید و تعیین تحمل به اسیدیته ۹۲

۳-۱-۲- تعیین تحمل به نمک های صفراوی ۹۳

۳-۱-۳ شناسایی فنوتیپیکی باکتریهای انتخاب شده ۹۷

۳-۱-۴ تعیین حساسیت انتروکوکسی های جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک ها ۱۰۳

۳-۱-۵ تکثیر توالی های ۱۶S rDNA ۱۰۵

۳-۱-۶ تهیهٔ نقشهٔ برشی قطعات تکثیر یافتهٔ ۱۰۶

۳-۱-۷ بررسی تنوع ژنتیکی سویه های انتروکوکسی با استفاده از تکنیک RAPD-PCR ۱۰۹

۳-۱-۸ تعیین توالی های تکثیر یافتهٔ ۱۶ S rDNA ۱۱۰

۳-۲ بحث ۱۱۶

فهرست جداول و شکل ها

شکل ۲-۱ توالی ۱۶S rDNA انتروکوکسی فاشیوم ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI ۸۵

جدول ۲-۱ غلظت اجزاء تشکیل دهندهٔ واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی..... ۸۶

جدول ۲-۲ محلول های مورد استفاده برای الکتروفورز ژل آگارز در الکتروفورز ۸۷

جدول۲-۳ بافر لودینگ ۶x..... ۸۷

شکل۲-۲- مراحل تخلیص محصولPCR ۸۸

جدول ۲-۴ اجزاء تشکیل دهندهٔ واکنش های هضم..... ۸۹

جدول ۲ -۵- غلظت اجزاء تشکیل دهندهٔ واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی برای انجام RAPD ۹۰

جدول ۳-۱ نتایج بدست آمده از انکوباسیون ۳ ساعته در ۳۷ درجهٔ سانتی گراد در PBS با pH= ۲/۵. ..... ۹۲

شکل ۳-۱ تاثیر محیط اسیدی PBS بر روی بقاء سویه های ایزوله شده ۹۴

شکل ۳-۲ تاثیر نمک های صفراوی (bile oxgall) بر روی رشد سویهٔ های جداسازی شده ۹۵

جدول ۳-۲ طبقه بندی باکتریهای ایزوله شده بر اساس مقاومت به نمکهای صفراوی ۹۶

جدول ۳-۳ مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس های با پتانسیل پروبیوتیکی.

ایزوله شده از۵ نوع ماست و۱ نوع پنیر محلی در شهرستان کلیبر..... ۱۰۰

جدول ۳-۴ مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انتروکوکسی های با پتانسیل پروبیوتیکی

ایزوله شده از۴ نوع پنیر محلی در شهرستان کلیبر..... ۱۰۱

شکل ۳-۳ دندوگرام مربوط به تحلیل آماری (با استفاده از برنامهٔ STATISTICA و روش UPGMA) نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی انجام شده

برای ۱۷ ایزولهٔ لاکتوباسیلوس ۱۰۲

شکل ۳-۴ دندوگرام مربوط به تحلیل آماری (با استفاده از برنامهٔ STATISTICA و روش UPGMA) نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی انجام

شده برای ۱۲ ایزولهٔ انتروکوکسی ایزوله شده در این تحقیق ۱۰۲

عنوان | صفحه

جدول ۳-۴ اندازهٔ قطر هاله های عدم رشد (مربوط به ۱۰دیسک آنتی بیوتیکی)

۶سویهٔ انتروکوکسی با پتانسیل پروبیوتیکی، جداسازی شده از پنیرهای محلی و ۲ سویهٔ استاندارد ۱۰۳

جدول۳-۵ تعیین حساسیت انتروکوکسی های ایزوله شده از پنیر های محلی با پتانسیل پروبیوتیکی و ۲ سویهٔ استاندارد..... ۱۰۴

شکل۳-۵ هاله های عدم رشد سویه های IE3 و FE1 در مقابل آنتی بیوتیک های استفاده شده..... ۱۰۵

شکل ۳-۶ الکتروفورز محصولات تکثیری توالی های ۱۶S rDNA برای ۱۲ سویهٔ ایزوله شدهٔ انتروکوکسی و ۲ سویهٔ استاندارد انتروکوکسی فاشیوم و انتروکوکسی فکالیس..... ۱۰۶

شکل ۳-۷ برش محصولات تکثیر یافته و برش بیوانفورماتیکی توالی های ۱۶ S rDNA گونه های انتروکوکسی ثبت شده در بانک اطلاعاتی با آنزیم MspI..... ۱۰۷

شکل ۳-۸ برش محصولات تکثیر یافته و برش بیوانفورماتیکی توالی های ۱۶ S rDNA گونه های انتروکوکسی ثبت شده در بانک اطلاعاتی با آنزیم TaqI..... ۱۰۸

شکل ۳-۹ الگوی باندی بدست آمده از تکثیر کل ژنوم سویه های انتروکوکسی با استفاده از آغازگرهای P1 (الگوی باندی قسمت بالای تصویر) و P2 (الگوی باندی قسمت پائین تصویر) در تکنیک RAPD-PCR..... ۱۱۰

شکل ۳-۱۰ الکتروفورز محصولات تکثیری توالی های ۱۶S rDNA بعد از خالص سازی به منظور ارسال برای توالی یابی..... ۱۱۱

شکل ۳-۱۱ قسمت هایی از پیک های مربوط به توالی یابی ۱۶S rDNA سویهٔ IE2 که از طریق تکثیر با آغازگر مستقیم حاصل شده است..... ۱۱۲

شکل ۳-۱۲ Align دو رشتهٔ Plus و معکوس مکمل رشتهٔ Minus مربوط به توالی یابی توالی ۱۶S rDNA سویهٔ DE1 با استفاده از برنامهٔ بیوانفورماتیکی BLAST(bl2seq) در NCBI..... ۱۱۳

شکل ۳-۱۳ بلاست توالی ۱۶S rDNA سویهٔ DE1 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی..... ۱۱۴

شکل ۳-۱۴ بلاست توالی ژن ۱۶ S rDNA سویهٔ IE2 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی و نمایش نوکلوتیدهای تغییر یافته نسبت به توالی موجود در بانک اطلاعات ژنی..... ۱۱۵

شکل ۳-۱۵ مکانیسم عمل عوامل ضد میکروبی گوناگون..... ۱۳۲

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

تعداد بسیار گوناگونی از میکروارگانیسمها در نقاط مختلف بدن وجود دارد؛ از جمله در مجرای روده ای، پوست، حفره های دهانی ، بینی و خلاصه هر بخشی از بدن که در معرض جهان خارج قرار گرفته است. بنابراین مناطق مذکور شرایط مطلوبی را جهت بقاء صدها گونه از باکتریهای همزیست[1] فراهم می سازند (۷۴). مطالعات بر روی حیوانات عاری از میکروب[2] ثابت نموده است که حیوانات به کلونیزه شدن میکروبی در بدن برای بقاء نیاز ندارند، اما بسیاری از اختلالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی در آنها به اثبات رسیده و مشخص گردیده است که این حیوانات به عفونتها مستعد می باشند. این امر را به نحوء فعالیت ضعیف سیستم ایمنی و شاید نبود باکتریهای فلور نسبت می دهند (۷۴). در موارد نادر میکروبهای فلور بدن یک بیماریزایی نسبی ایجاد می کنند و باعث بروز بیماری یا مرگ می شوند. تأثیر میکروبهای ساکن در مناطق مختلف بدن در معارضه و در درگیری با بدن انسان شناخته شده است، در نتیجه نیاز به ایجاد فعالیتهای مثبت و سست کردن فعالیتهای منفی باکتریهای فلور و میکروبهای مهاجم اشاره به تئوری پروبیوتیک دارد (۷۴). تقریباً 10^{12} باکتری به ازای هر گرم از محتویات موجود در روده بزرگ وجود دارد که شامل صدها گونه از باکتریهای مختلف می باشند. این مجموعه میکروبی یک تأثیر نیرومندی بر روی میزبان دارند. بنابراین مصرف پروبیوتیک ها می تواند به طور مثبت بر روی ترکیب ساختار این میکروارگانیسم ها و تداوم میزان سلامتی میزبانی که در آن حضور دارند می تواند موثر باشد (۴۰). باکتریهای پروبیوتیک به عنوان مکمل های غذایی زنده میکروبی تعریف می شوند که به طور مفید با اصلاح تعادل میکروبی روده، میزبان را تحت تاثیر قرار می دهد (۹۰). بیشتر سویه های پروبیوتیک ساکنان طبیعی رودهٔ انسان ها و حیوان ها هستند (۹۰). در حال حاضر رایج ترین باکتریهای پروبیوتیک از دو جنس لاکتوباسیلوس (*Lactobacillus*) و بیفیدوباکتریوم (*Bifidobacterium*) می باشد، اما گونه هائی از انتروکوکوس

[1] *commensal*
[2] *germ free*

(*Enterococcus*)، باسیلوس (*Bacillus*) و استرپتوکوکوس (*Streptococcus*) نیز پتانسیل بالائی دارند. سابقاً پروبیوتیک ها به عنوان اجزایی از محصولات لبنی تخمیر شده مثل ماست و نیز نوشیدنی هایی مثل یاکولت[1] مصرف می شده اند. امروزه بیش از ۷۰ محصول دارای باکتریهای اسید لاکتیکی از جمله خامهٔ ترش، ماست، شیر پودر شده، و کره در سرتاسر جهان وجود دارد (۵۶).

پروبیوتیک ها به طور افزاینده ای به عنوان مکمل های رژیمی به صورت قرص، کپسول، و آمایش های منجمد- خشک شده به بازار عرضه می شوند (۷۹). اخیراً، آزمون های بالینی اثرات سودمند و پیشبرنده سلامتی باکتریهای پروبیوتیک را که به غذاهای انسانی و حیوانی وارد شده اند، نشان داده است. این اثرات شامل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تحریک سیستم ایمنی، تعدیل هموستازی ایمنی سیستمیک، خصوصیات ضد توموری، و اصلاح عدم تحمل لاکتوز می باشد (۷۹). علاوه بر این اثرات سودمند سلامتی، محققان نشان داده اند که باکتریهای پروبیوتیک با تولید باکتریوسین ها و اسیدهای آلی به عنوان ضد میکروب، رشد پاتوژن ها را مهار و همچنین عملکرد سلولهای ایی تلیال روده ای را بهتر می کند (۷۹).

۱-۲- تاریخچه

اگرچه بکارگیری واژهٔ پروبیوتیک مرتبط با مکمل های غذایی فقط از سال ۱۹۷۴ به بعد بوده است، اما تاریخچه حقیقی بکارگیری مکمل های غذایی میکروبی به هزاران سال قبل باز می گردد (۷۴). احتمالاً نخستین غذای حاوی میکروارگانیسم های زنده، شیر تخمیر شده بود که در بخش عهد عتیق انجیل مورد اشاره قرارگرفته است (۷۴). همچنین نقاشی های روی دیوار مربوط به ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح نشان می دهد که سومریان نیز از شیرهای تخمیر شده استفاده می کردند. مصرف شیر تخمیر شده به اشکال مختلف تا حال حاضر ادامه یافته است (۷۴). در طول نیمه دوم قرن نوزدهم، مطالعات اولیه روی

---

[1]) *yakult*

میکروارکانیسم ها در رابطه با واکنشهای آنها با میزبان انسانی، هر چند ابتداً با یک دیدگاه منفی، انجام گرفت. با این حال، به زودی اسچریچ (Escherich) میکروبیوتا (microbiota) را در سال ۱۸۸۵ و کلونیزاسیون اولیه دستگاه گوارشی کودک را در سال ۱۸۸۶ توصیف کرد و سودمندی آنها برای هضم غذا را پیشنهاد داد (۱۶). با این وجود، دودرلین (*Doderlein*) گویا اولین دانشمندی بود که ارتباط سودمندی باکتریهای واژن[1] را با تولید اسید لاکتیک از قندها، پیشنهاد داد که به موجب آن از رشد باکتریهای پاتوژن پیشگیری و یا آنها را مهار می کند (۱۶).

تحقیقات اخیر بر اهمیت یک جمعیت میکروبی سالم و حیاتی در دستگاه گوارشی تاکید کرده اند؛ مخصوصاً ارتباط سودمند باکتریهای اسید لاکتیک با میزبان انسان که بیش از صد سال پیش بر اساس مطالعات اکولوژیکی و تاکسونومیکی بوسیله مورو (*Moro*) در سال ۱۹۰۰، بیجرینک (*Beijerinck*) و کاهن (*Cahn*) در سال ۱۹۰۱ پیشنهاد شد، تائید شده است و به وسیله تلاشهای پژوهشی رو به افزون در طول سه دهه اخیر گسترش یافته است (۱۶). چنین باکتریهای اسید لاکتیکی همچنین در ارتباط با محصولات شیر ترش شده یافت شدند و منفعت های سلامتی آنها به وسیله میچنکف (*Metschinkoff*) در سال ۱۹۰۸ حمایت شد (۸۹). میچنکوف (*Metschinkoff*) در پرفروش ترین کتاب خود"طولانی کردن زندگی"[2] گویا اولین کسی بود که از مزایای سلامتی باکتریهای اسیدلاکتیکی مرتبط با محصولات شیر تخمیر شده طرفداری کرد. او پیشنهاد کرد که طولانی بودن عمر مردم قفقاز مربوط به مصرف زیاد محصولات شیر تخمیر شده می باشد. اگرچه میچینکوف (*Metschinkoff*) میکروبهای روده را زیان آور می دانست، او جایگزینی میکروبهای روده به وسیله باکتریهای ماست را مفید عنوان کرد. او متصور بود که تولید اسید لاکتیک در نتیجه تخمیر قند به وسیله باکتریهای اسید لاکتیکی، می تواند از سودمندی خاصی برخوردار باشد (۸۹).

---

[1] Vaginal bacteria
[2] The Prolongation of Life

بیفیدوباکتریا (*Bifidobacteria*) گروه دیگر تولید کننده های اسید لاکتیکی که از نظر فیلوژنتیکی مجزا ولی معمولاً به عنوان بخشی از باکتریهای اسیدلاکتیکی پذیرفته می شود، در سال ۱۸۸۹ کشف و در اوایل سال ۱۹۰۰ به وسیله تیزر(*Tissier*) توصیف شد (۸۹). این باکتریها به طور تیپیکی با مدفوع نوزادان به ویژه نوزادان تغذیه شده با شیر مادر مرتبط می شود (۸۹). در مقایسه با نوزادان تغذیه شده با غذای فرموله شده، وقوع پائین تری از ناراحتی های روده ای در نوزادان تغذیه شده با شیر مادر دیده شد و به موجب آن فرضیهٔ ارتباط سودمند بیفیدوباکتریا (*Bifidobacteria*) با دستگاه گوارشی انسان پایه گذاری شد (۸۹).

در سال ۱۹۳۰ دانشمند ژاپنی مینورا شیروتا (*Minora shorota*) یک باکتری اسید لاکتیکی از مدفوع نوزاد سالم جداسازی کرد. پنج سال بعد او یک نوشیدنی شیر تخمیر شده، با تصور حمایت سلامت روده ای با سویه ای که او ترویج داده بود، معرفی کرد و نام آن را یاکولت[1] گذاشت (۳۰). مفهوم استفاده از پروبیوتیک در آسیا برای چندین سال موفقیت آمیز بود، تا اینکه اولین محصولات پروبیوتیک شیر تخمیر شده، در نهایت در سال ۱۹۸۰ در اروپا معرفی شد (۳۰). امروزه محصولات غذائی پروبیوتیک با محتویات بیفیدوباکتریا و/ یا لاکتوباسیل ها (*bifidobacteria* and/or *Lactobacilli*) به وسیله میلیونها نفر در سرتاسر جهان مصرف می شود (۳۰).

۱-۳- مفهوم و تکامل واژه پروبیوتیک

پروبیوتیک یا عامل شفادهنده زیستی یک ارگانیسم زنده است که با ایجاد اختلال در عملکرد پاتوژنها در حفظ سلامت میزبان بسیار موثر است. واژهٔ پروبیوتیک بر گرفته از کلمهٔ یونانی پروبیوس به معنای برای زندگی می باشد که طی سالیان متمادی بکارگیری این واژه، معنی آن همواره در حال تغییر بوده است (۸۸). اصطلاح پروبیوتیک گویا اولین بار به وسیله کولاچ (Kolllath) در سال ۱۹۵۳ تعریف شد؛ او این اصطلاح را برای همه ترکیبات آلی و معدنی مواد غذائی به منظور افزایش ارزش غذایی چنین ترکیبات غذائی به عنوان مکمل ها، پیشنهاد کرد (۸۰). لی لی و استیل ویل (Lilley and Stillwell) در سال ۱۹۶۵ این

اصطلاح را برای مواد مترشحه به وسیله میکروارگانیسمهایی که موجب تحریک رشد سایر میکروارگانیسمها می شوند، به کار بردند. بنابراین این ترکیبات کاملاً در مقابل آنتی بیوتیک ها یا مواد پادزیست قرار می گیرند (۸۰). اسپرتی (*Sperti*) در سال ۱۹۷۱ از این واژه تحت عنوان عصاره های بافتی موجب تحریک رشد میکروبی یاد کرد (۸۰). چند سال بعد اصطلاح پروبیوتیک در مباحث خوراک های حیوانی به وسیله پارکر و فولر (*Parker and Fuller*) استفاده شد (۸۰). در سال ۱۹۷۴ پارکر(*Parker*) تعریفی ارائه نمود که پروبیوتیکها ارگانیسمها یا موادی هستند که به تعادل میکروبی روده کمک می کنند (۸۰). در سال ۱۹۸۹ فولر (*Fuller*) تعریف جامعتری ارائه کرد و اظهار داشت که پربیوتیکها مکمل های غذائی میکروبی هستند که از طریق اصلاح تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی بر روی میزبان دارند (۸۰). اگرچه تعریف های متعددی از آن زمان پیشنهاد شده است، اما به خاطر احساس نیاز برای توضیح های تکمیلی راجع به اظهاراتی مثل تعادل سودمند، جمعیت نرمال یا تثبیت فلور روده ای هیچ کدام از آنها به طور کامل رضایت بخش نبوده است (۸۰). یک تعریف جامع و تا حدودی کلی که به وسیله دانشمندان آلمانی پیشنهاد شده است، بیان می کند که پروبیوتیکها به عنوان میکروارگانیسمهای زنده ای هستند که وقتی با مقادیر مناسب به روده برسند، اثرات مثبت اعمال خواهند کرد (۸۰). آخرین تعریف به منظور مصارف انسانی توسط سالمنین (Salminen) و همکارانش در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد شده است؛ آنها پروبیوتیکها را یک اجزاء زنده میکروبی غذا عنوان کردند که برای سلامتی سودمند است (۸۰). مفهوم امروزی به میکروارگانیسمهای زنده ای اشاره می کند که تعادل سودمند جمعیت میکروبی فلور دستگاه گوارشی را اصلاح و یا از آن حمایت می کند (۴۰). این میکروارگانیسمها ممکن است ضرورتاً ساکنان اصلی دستگاه گوارشی نباشد، اما اثر سودمند آنها روی سلامتی انسان و حیوان باید تأئید شود (۴۰). این تعریف همچنین در پیشنهاد هاونار (Hawenaar) و همکارانش منعکس می شود؛ که پروبیوتیکها را به عنوان کشت های خالص یا مخلوطی از میکروارگانیسمهای زنده تعریف می کنند که هنگام استفاده برای حیوان یا انسان، به طور سودمند میزبان را با