



جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی لاکتوباسیلوس ها از لبنیات سنتی روستاهای استان فارس و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آنها

ندا زمانی^۱، عباس اخوان سپهی^{۲*}، محمد رضا فاضلی^۳، فرید شریعتمداری^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۵

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

لاکتوباسیلوس،

جداسازی،

16S rRNA.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.41

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5

* مسئول مکاتبات:

akhavansepahy@gmail.com

لاکتوباسیلوس ها شناخته شده ترین سویه های دارای خواص پروبیوتیکی می باشند که اثر به سزایی در ارتقا سلامت دستگاه گوارش دارند. هدف از این مطالعه، جداسازی و بررسی خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس های بومی موجود در لبنیات استان فارس می باشد. از نمونه های لبنیات، باسیل های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی و توسط روش های شیمیایی بررسی شدند. برای ارزیابی خواص پروبیوتیکی جدایه ها، میزان رشد آنها در pH های مختلف اسیدی و قلیایی، غلظت های مختلف نمک صفراوی و نمک NaCl مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی جدایه ها بر روی باکتری های پاتوژن با روش چاهک گذاری بررسی و همچنین تست حساسیت به آنتی بیوتیک های رایج با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. سویه های بهینه، توسط توالی یابی ژن 16S rRNA از لحاظ مولکولی شناسایی شدند. از مجموع ۳۶ سویه ی گرم مثبت و کاتالاز منفی ۱۰ سویه از نظر بیوشیمیایی شبیه به لاکتوباسیلوس ها بودند که ۵ سویه توانایی رشد در pH ۳ تا ۹ و غلظت های مختلف نمک صفراوی و نمک NaCl را داشتند. این باکتری ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن های متداول بوده و در برابر آنتی بیوتیک های کلیندامایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین مقاوم بودند. سویه ی M3 و Y4 دارای خواص پروبیوتیکی بهتری بودند. ارزیابی مولکولی نشان داد این دو سویه به ترتیب دارای شباهت ۱۰۰٪ و ۹۹٫۹۸٪ با سویه های لاکتوباسیلوس برویس و لاکتوباسیلوس کازئی هستند. در نتیجه مشخص شد که این دو سویه لاکتوباسیلوس با خواص پروبیوتیکی تایید شده در لبنیات سنتی استان فارس موجود هستند که می توان از آنها در صنایع غذایی لبنی و جهت ارتقا کیفیت غذای دام و طیور استفاده کرد.

۱- مقدمه

گروه باکتریهای اسید لاکتیک (LAB¹) نقش مهمی در فرآیندهای تخمیر در صنایع غذایی و لبنیات دارند. در میان باکتری های اسید لاکتیک مختلف، لاکتوباسیلوسها عمدتاً برای تولید اسید لاکتیک استفاده میشوند، اما آنها مسئول تولید اسیدهای آلی، گاز، طعم، عطر و بافت در غذا و محصولات لبنی نیز هستند. این باکتریها همچنین مزایای درمانی و سلامتی را در مصرف کنندگان افزایش میدهند. خواص ارتقاء دهنده سلامتی در باکتری های اسید لاکتیک به ویژگیهای پروبیوتیکی آنها مربوط میشود [۱]. پروبیوتیکها میکروارگانیسمهای زنده ای هستند که میتوانند فواید سلامتی را برای میزبان در صورت مصرف در مقادیر تعیین شده مناسب، ارائه دهند. در حقیقت، اخیراً مصرف پروبیوتیکها توسعه یافته است و آنها میتوانند میکروبیوم روده انسان را که در اثر عدم تعادل میکروبی آسیب دیده است، متعادل و ترمیم کنند [۲]. در سالهای اخیر با ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی، تأکید زیادی بر بررسی پروبیوتیکها و محصولات آنها به عنوان جایگزین آنتی بیوتیکها شده است. فعالیت آنتاگونیستی پروبیوتیکها در برابر عوامل بیماریزا با مجموعه ای از مکانیسمها ایجاد میشود که شامل حذف رقابتی عوامل بیماریزا، افزایش عملکرد سدودهای تولید ترکیبات ضد میکروبی موثر مانند پپتیدها میشود [۳]. بیشتر باکتری های اسید لاکتیک به عنوان میکروارگانیسمهای "ایمن" طبقه بندی میشوند زیرا غیربیماریزا و مناسب برای فرایندهای تکنولوژیکی و صنعتی هستند [۴]. آنها گروهی از باکتری های گرم مثبت و بدن اسپور هستند که اسید لاکتیک در آنها به عنوان محصول نهایی در تخمیر کربوهیدراتها تولید می شود. امروزه نیاز فزاینده ای به گونه های جدید باکتری های اسید لاکتیک وجود دارد که ویژگیهای پروبیوتیک را ارائه میدهند و بر رفاه و سلامت انسان و حیوان تأثیر میگذارد [۵]. همچنین، LAB ها نقطه کانونی تحقیقات فشرده جهانی هستند به دلیل نقش اساسی آنها در اکثر غذاهای تخمیر شده و همچنین به دلیل توانایی که در ایجاد ترکیبات ضد میکروبی مختلف با افزایش خواص پروبیوتیک، کاهش کلسترول سرم، تثبیت میکروفلور روده، کاهش عدم تحمل لاکتوز و تحریک سیستم ایمنی بدن دارند [۶].

1. Lactic acid bacteria

ترین جنس های باکتری های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس [۷]، انتروکوکوس [۸]، استرپتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم [۹] می باشند. از ویژگی های مهم دیگر برخی از لاکتوباسیلوس ها، توان تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک های صفاوی است که وجود این توانایی ها از خصوصیات پروبیوتیکی آنها است [۱۰]. باکتریها برای پروبیوتیک بودن باید ویژگیهایی از جمله قابلیت اتصال به سلولهای اپیتلیال روده، غیر تهاجمی و غیر بیماریزا بودن، قابلیت کلونیزه شدن در دستگاه گوارش انسان، قابلیت ممانعت از اتصال باکتریهای پاتوژن به مخاط روده را داشته باشند [۱۱]. شناسایی، غربالگری و جداسازی LAB از محصولات طبیعی از موثرترین روشها برای به دست آوردن سویه های مناسب برای اهداف تجاری است [۱۲]. مقادیر زیادی از محصولات لبنی مختلف به طور سنتی از شیر نشخوارکنندگان در سراسر جهان تولید میشود. خواص و تنوع مختلف پنیهای سنتی تولید شده از شیرخام به فلور میکروبی آنها بستگی دارد [۱۳]. به طور کلی، سویه های تجاری در تولید لبنیات سنتی استفاده میشوند و تولیدکنندگان لبنی سنتی عمدتاً به LAB طبیعی موجود در شیر برای دستیابی به خواص اسید لاکتیک مورد نیاز تکیه میکنند [۱۴]. امروزه تولید محصولات لبنی به طور عمده با استفاده از آغازگرهای تجاری مشخص، باعث شده که این محصولات نسبت به محصولات تولیدی با روشهای سنتی، از عطر و طعم مطلوبی برخوردار نباشند [۱۵]. به همین دلیل امروزه سویه های بومی باکتری های اسید لاکتیک اهمیت ویژه ای در صنایع لبنی یافته اند چرا که این سویه ها علاوه بر آنکه دارای خصوصیات سازگاری با شرایط همان منطقه می باشند از توانایی خاص در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع فرآورده های تخمیری برخوردار هستند، بنابر این جداسازی و شناسایی سویه های بومی هر منطقه نقش بسیار مهمی در صنعت لبنیات و همچنین سلامت افراد آن جامعه بر عهده دارد [۱۶]. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی لاکتوباسیلوسهای موجود در لبنیات سنتی استان فارس است. این اقدام گامی در جهت توسعه استارترها و جهت استفاده در صنایع لبنی پروبیوتیک و برای تولید محصولات سالم دارای طعم و بافت بهتر و ارتقا سطح سلامت افراد جامعه است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری نمونه ها

لبنیات سنتی به تعداد ۴۰ نمونه شامل ۱۲ شیر خام، ۱۵ ماستو ۱۳ پنیر از دو روستای قلات و دشتک در استان فارس در شرایط استریل جمع آوری و درکنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند، نمونه ها تا هنگام شروع آزمایش در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲- تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت

در ابتدا جهت غنی سازی باکتری ها، نمونه های شیر، ماست و پنیر در محیط MRS^2 broth در شرایط بی هوازی و در انکوباتور CO_2 دار با CO_2 ۱۰٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس نمونه ها به محیط MRS agar منتقل و در شرایط بی هوازی و در انکوباتور CO_2 دار با CO_2 ۱۰٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند.

۲-۳- جداسازی و خالص سازی

جهت خالص سازی، تمام کلنی های حاصله از لحاظ رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند و باسیل های گرم مثبت و کاتالاز منفی در محیط MRS agar کشت داده شده و در شرایط بی هوازی در در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و در نهایت کشت خالص بدست آمد [۱۴].

۲-۴- شناسایی جدایه ها

جهت شناسای اولیه، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، رنگ آمیزی کپسول و اسپور، احیای نیترات، تست حرکت، سیمون سترات، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، تست SIM^3 و تست تولید گاز از گلوکز در محیط MRS broth حاوی لوله دورهام در شرایط بی‌هوازی انجام گرفت و همچنین تست تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف شامل آرابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریوز، زایلوز، ساکارز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، مانیتول، ملویبوز، ملوزیتوز و

سالیسین در محیط کشت MRS broth انجام شد [۱۷]. برای این منظور کشت تازه (۲۴ ساعته) به محیط کشت MRS broth بدون قند دست ساز شامل عصاره گوشت ۱۰ گرم، پیتون پروتئاز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۴ گرم، سدیم استات ۵ گرم، دی‌آمونیم سترات ۲ گرم، منیزیوم سولفات ۰٫۲ گرم، منگنز سولفات ۰٫۰۵ گرم، پتاسیم فسفات ۲ گرم، تووین ۸۰ یک سی سی و بروموکروزول پرپل ۰٫۰۵ گرم با ۱٪ غلظت قند مورد نظر انجام شد و توانایی تخمیر و تولید گاز در طی ۷۲ ساعت با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید [۱۸].

۲-۵- ذخیره سازی و نگهداری باکتری ها

در جهت ادامه روند آزمایشات بعدی، سویه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS broth با گلیسرول ۱۸٪ به نسبت ۱:۱ استوک شد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره و نگهداری شدند [۱۹].

۳- بررسی پتاسیل پروبیوتیکی

لاکتوباسیلوس های جداسازی شده

برای بررسی پتانسیل و خصوصیات پروبیوتیکی سویه های جدا شده تست هایی زیر بر روی آنها انجام شد.

۳-۱- تست مقاومت به pH های اسیدی

(اسید معده) و قلیایی

به منظور انجام این آزمون محیط کشت MRS broth با pH های مختلف از ۱ تا ۹ (تنظیم pH با HCl ۱ نرمال و سود ۵٪) تهیه گردید و سپس جدایه ها در این این محیط‌ها کشت و در انکوباتور CO_2 دار با CO_2 ۱۰٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و در زمان‌های ۰ تا ۷۲ ساعت کدورت محیط های کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتری در ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار رشد آنها رسم شد [۲۰].

۳-۲- تست مقاومت به نمک صفراوی

بدین منظور محیط کشت MRS broth با غلظت های ۰٫۱، ۰٫۳، ۰٫۶، ۰٫۹ و ۱٫۲ درصد ماده Oxgall و با pH ۶ تهیه شد و سپس سویه های جداسازی شده در این این محیط‌ها کشت و در انکوباتور CO_2 دار با CO_2 ۱۰٪ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به

2. De Man, Rogosa and Shrpe
3. Sulfide-Indole-Motility

۶- شناسایی مولکولی

۶-۱- استخراج DNA و تکثیر ژن 16S

rRNA⁴

DNA باکتری توسط کیت DNP (سیناکلون، ایران) با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج شد، کمیت و کیفیت نمونه‌های استخراج شده با استفاده از نانودراپ بررسی شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سویه‌های لاکتوباسیلوس ناحیه 16S rRNA (تکاپوزیست، ایسران) شامل (5' HalF (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') و (3' AAGGTTACCTCACC GACTTC 5') تکثیر DNA ژنوم باکتری توسط واکنش PCR⁵ انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و سپس نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. در نهایت توالی‌های به دست آمده در سایت NCBI بلاست شدند و ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی تعیین گردید [۲۴].

۷- یافته‌ها

۷-۱- جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی

لاکتوباسیلوس های جدا شده

از ۴۰ نمونه لبنیات محلی استان فارس (۱۲ شیر خام، ۱۵ ماستو ۱۳ پنیر)، بر اساس نتایج اولیه حاصل از بررسی مورفولوژی کلنی، واکنش گرم و کاتالاز، ۳۶ سویه باکتری باسیلوس گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شد. براساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی و میکروبی تعداد سویه‌های جداسازی شده به ۱۰ سویه، ۳ جدایه از شیرخام (M1, M2, M3) و ۴ جدایه از ماست (Y1, Y2, Y3, Y4) و ۳ جدایه از پنیر (C1, C2, C3) کاهش یافت. سویه‌های جداسازی شده، بی-هوازی، گرم مثبت، کاتالاز منفی، کپسول منفی، تاژک منفی، هیدرولیز ژلاتین منفی، اندول منفی، فاقد تحرک، احیای نیترات منفی، اکسیداز منفی، اسپور منفی و سیمون سیترات منفی بودند. نتایج آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی و تخمیر قند در جدول ۱ و جدول ۲ نشان داده شده است.

مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس کدورت محیط کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتری با جذب نوری ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و نمودار رشد آنها رسم گردید [۲۱].

۳-۳- تست تحمل غلظت های مختلف نمک

NaCl

غلظت های ۰،۵ و ۶،۵ درصد نمک NaCl به محیط کشت MRS broth اضافه شد و سویه های جدا شده در این غلظت ها کشت داده شدند و در شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون قرار گرفتند و سپس کدورت محیط کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتری مورد سنجش قرار گرفت و نمودار رشد آن ترسیم شد [۲۰].

۳-۴- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه های

جداسازی شده

جهت بررسی فعالیت آنتاگونیستی باکتری های جداسازی شده بر روی پاتوژن ها، لاکتوباسیلوس هادر محیط MRS broth و در شرایط بی‌هوازی کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایه رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد. سپس فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های جدا شده از باکتری‌ها روی باکتری‌های پاتوژن شاخص سالمونلاتیفی موریوم، سودوموناس اثرورینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی به روش چاهک‌گذاری بررسی شد و قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری و ثبت گردید، در این روش باکتری های پاتوژن به روش نیم مک فارلند رقیق سازی شدند و مقدار باکتری ها در حدود $1,5 \times 10^8$ تعیین شد [۲۲].

۳-۵- سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک

حساسیت و مقاومت باکتری های جداسازی شده، نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کلیندامایسین، آمپسی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت [۲۳].

4. 16S ribosomal RNA
5. Polymerase chain reaction

Table 1 Results of microbial and biochemical tests of 10 gram-positive and catalase-negative bacilli isolated from 40 samples of traditional dairy products in Fars province

C3	C2	C1	Y4	Y3	Y2	Y1	M3	M2	M1	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Capsule
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Catalase
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Flagella
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gas
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gelatin Hydrolysis
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Gram Staining
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Indole
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Motility
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nitrate Reduction
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	Oxidase
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Shape
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	Spore
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Urease
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Simmon Citrate

Table 2 Results of sugar fermentation tests in 10 gram-positive and catalase-negative bacilli isolated from 40 traditional dairy samples in Fars province

C3	C2	C1	Y4	Y3	Y2	Y1	M3	M2	M1	
v	+	+	+	+	-	v	+	+	v	Arabinose
+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Inositol
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Trehalose
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	Raffinose
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	Rhamnose
-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	Ribose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xylose
-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Sucrose
-	+	+	+	v	-	v	+	+	v	Cellobiose
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Fructose
+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	Galactose
+	+	+	+	-	+	v	+	+	v	Glucose
-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	Lactose
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Mannose
+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	Mannitol
-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	Melibiose
-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Melositosis
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Salicin

لاکتوباسیلوس ها شناسایی شدند، سپس از نظر مقاومت به pH های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها در pH بین ۲ تا ۵ رشد خوبی داشته و بهینه رشد در pH 5 بود. همچنین سویه‌های جدا شده توانایی رشد در pH قلیایی را داشتند. با توجه نتایج آزمایشات سویه M3 و Y4 نسبت به بقیه دارای تحمل بالایی نسبت به طیف وسیعی از pH بود (شکل ۱). مقاومت به

۲-۷- بررسی پتاسیل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس

های جداسازی شده

۲-۷-۱- مقاومت به pH

پس از بررسی تست‌های بیوشیمیایی ۵ جدایه (M2, M3, Y2, Y4, C1) با خصوصیتی نزدیک به

می‌توانند به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شوند.

pHهای مختلف یکی از خواص مهم پروبیوتیک‌ها است. بنابراین سویه انتخاب شده به دلیل تحمل pHهای اسیدی و قلیایی

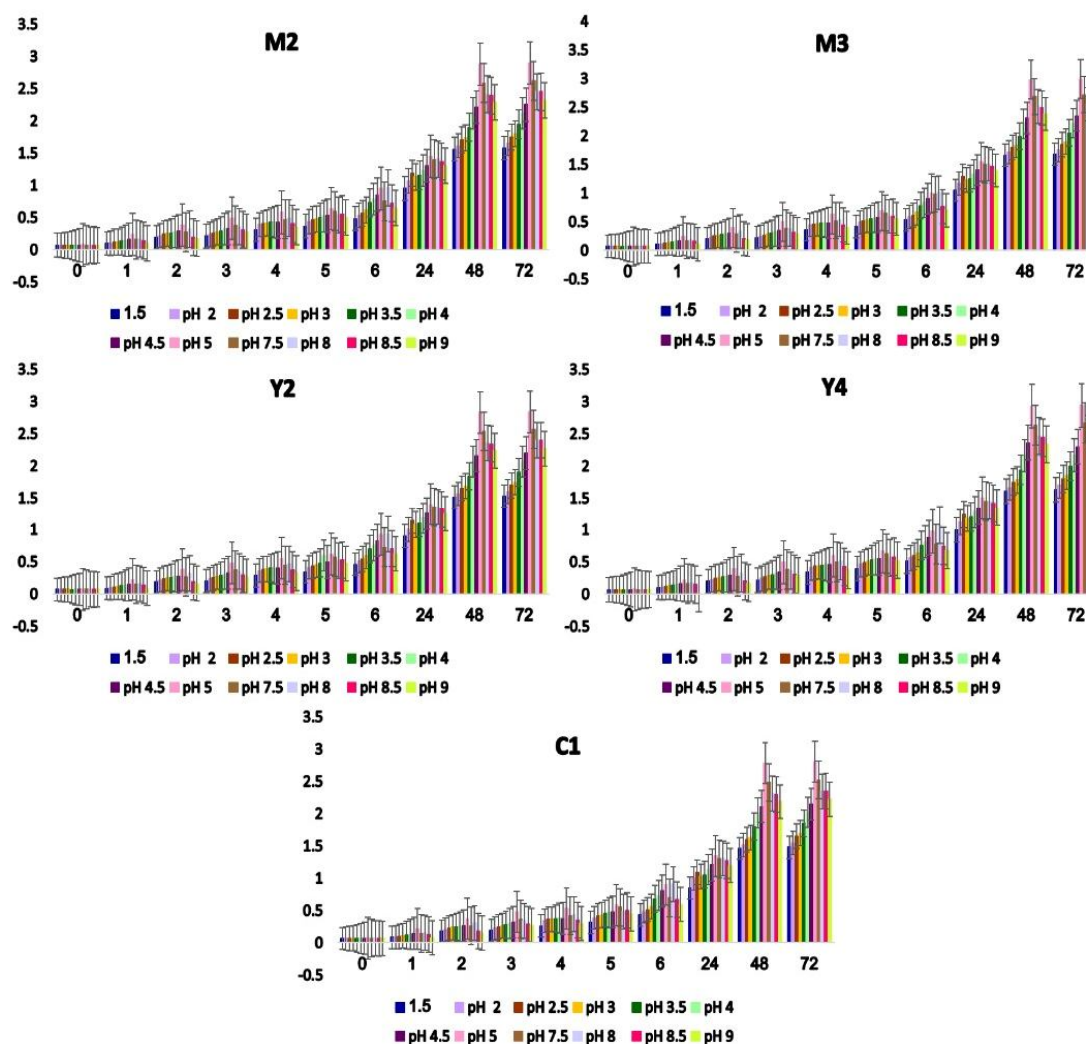


Fig 1 Growth chart of bacteria M2, M3, Y2, Y4 C1, at pH 1 to 9

بهترین نتیجه در جدایه M3 و Y4 مشاهده شد (شکل ۲). مقاومت به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی نیز یکی دیگر از خواص مهم پروبیوتیک‌ها می‌باشد. در نتیجه سویه انتخاب شده به دلیل تحمل زیاد نسبت به نمک‌های صفراوی این قابلیت را دارد که به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شود.

۷-۲-۲- مقاومت به نمک صفراوی

۵ جدایه (M2, M3, Y2, Y4, C1) دارای خصوصیات مشابه لاکتوباسیلوس‌ها، از نظر مقاومت به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها مقاومت خوبی نسبت به غلظت‌های مختلف Ox-gall را نشان دادند.

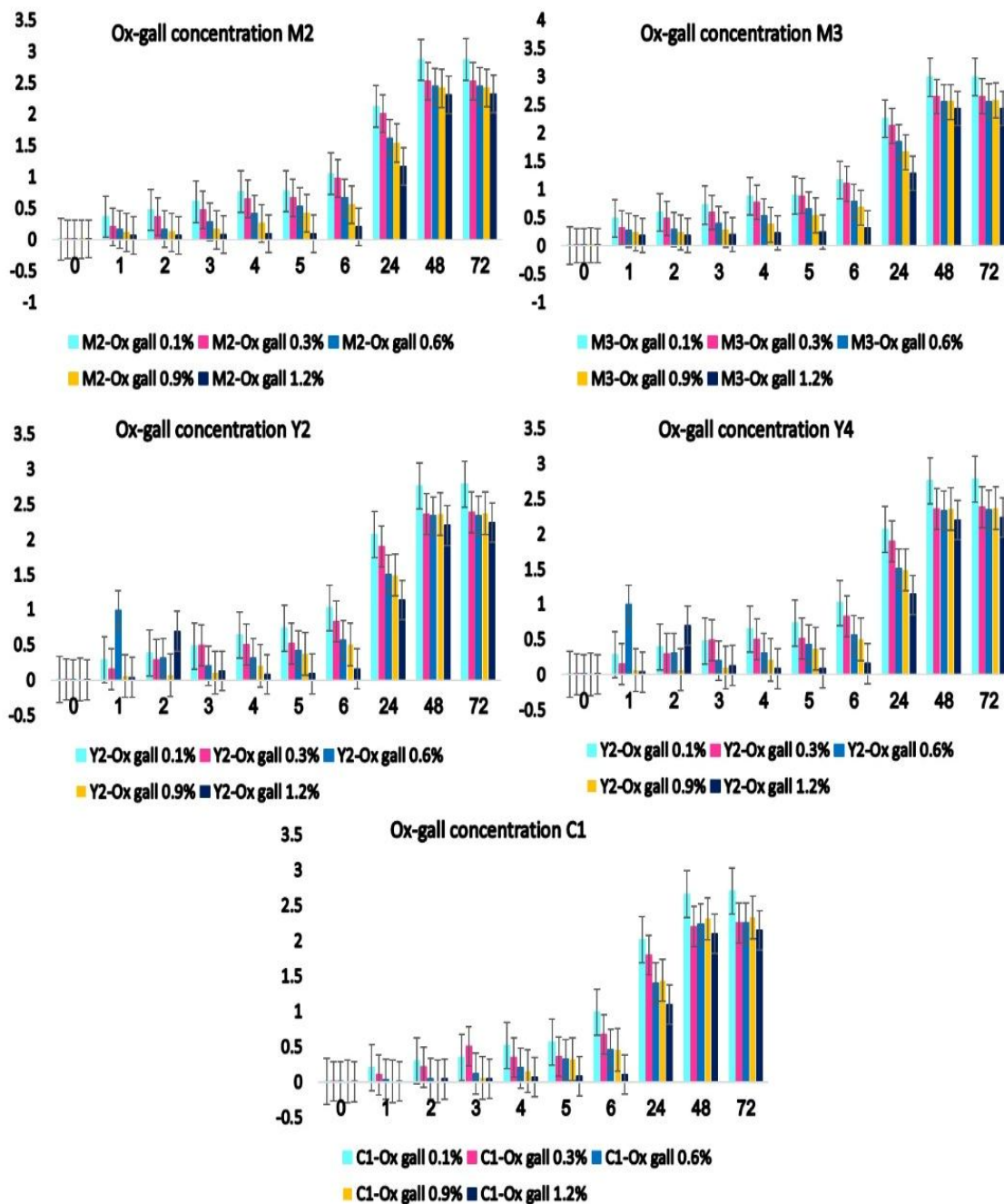


Fig 2 Growth chart of bacteria M2, M3, Y2, C1, Y4 in different dilutions of bile salt

۷-۲-۳- تحمل غلظت‌های مختلف نمک NaCl

سویه M3 و Y4 بود (شکل ۳). رشد در غلظت‌های بالای نمک NaCl از خصوصیات پروبیوتیکی محسوب می‌شود.

غلظت‌های مختلف نمک NaCl در ۵ جدایه منتخب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه‌های انتخابی رشد خوبی در غلظت‌های مختلف نمک داشته و بهترین نتیجه مربوط به

۷-۲-۴-ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و سنجش

حساسیت به آنتی بیوتیک

اثر فعالیت‌های ضد باکتریایی جدایه‌های *Lactobacillus* های سالمونلاتیفی انتخابی با روش چاهک‌گذاری در برابر پاتوژن های *Salmonella typhimurium*، *Moraxella*، *S. aureus*، *Yersinia enterocolitica*، *Staphylococcus aureus* و *Shigella flexneri* بررسی شد. نتایج مربوط به قطر هاله های عدم رشد در سویه های مختلف، متفاوت و بین ۷ تا ۱۵ میلی متر بود. جدایه ها بر روی پاتوژن ها فعالیت ضد باکتریایی داشته و همچنین سویه های M3 و Y4 دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بودند. نتایج بدست آمده در جدول ۳ نشان داده شده است.

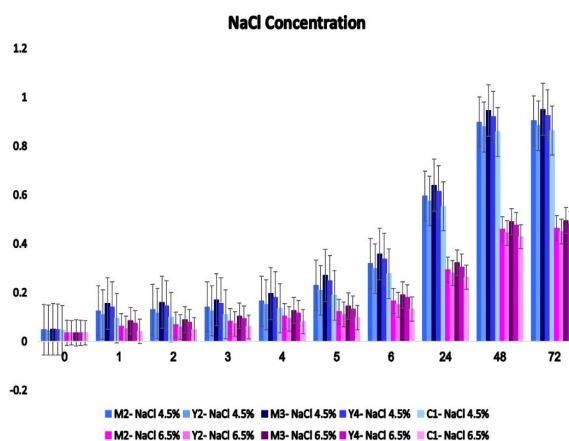


Fig 3 Growth chart of M2, Y2, M3, Y4 and C1 bacteria in dilution of 4.5 and 6.5% NaCl salt

Table 3 Antibacterial activities of selected *lactobacilli* against various pathogens

	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
M2	10 mm*	11 mm	9 mm	8 mm
M3	9 mm	10 mm	13 mm	10 mm
Y2	7 mm	8 mm	9 mm	7 mm
Y4	9 mm	15 mm	12 mm	9 mm
C1	8 mm	9 mm	10 mm	7 mm

*millimeter

این بررسی در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدایه های مورد بررسی در برابر تعدادی از آنتی بیوتیکها شامل از لحاظ حساسیت و مقاومت مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج

Table 4 The results test of resistance of isolated *lactobacilli* to common microbial antibiotics

	Chloramphenicol	Erythromycin	Ampicillin	Clindamycin	Tetracycline
M2	R*	R	R	S	S
M3	S**	R	R	R	R
Y2	R	S	R	S	S
Y4	S	R	R	R	R
C1	S	S	S	R	S

* Resistant ** Sensitive

رسم شد. (شکل ۴) نتایج توالی یابی نشان داد که سویه *Lactobacillus* M3 دارای شباهت ۱۰۰ درصدی با سویه *Lactobacillus brevis* strain T118 است و سویه Y4 دارای شباهت ۹۹٫۸۹ درصدی با *Lactobacillus casei* strain 1SA1 می باشد.

۸- شناسایی مولکولی

با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه، مشخص شد که دو سویه دارای خصوصیات پروبیوتیکی بهتری بودند؛ در نتیجه این دو سویه جهت توالی یابی ژنوم 16S rRNA ارسال شدند و سپس نتایج در سایت NCBI بلاست و درخت فیلوژنتیکی برای آنها

شیرهای تخمیر شده و سایر محصولات لبنی دارند [۲۸]. هدف از این پژوهش‌شناسایی و جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس دارای ویژگی‌های بالقوه پروبیوتیک بومی ایران از لبنیات سنتی استان فارس و ارزیابی آنها به منظور کشف پتانسیل‌های تولید مواد افزودنی برای صنایع لبنی بود.

pH شیر معده به عنوان معیار مهمی برای عملکرد پروبیوتیک‌ها در نظر گرفته می‌شود [۲۹]. قدرت بقاء لاکتوباسیلوسها در pH های اسیدی و حضور نمک صفراوی بسیار مهم می باشد چرا که مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم را با طیفی از استرس‌های دستگاه گوارش که در معده شدت می گیرند، روبرو می کند در نتیجه مقاومت به اسید معده و نمک صفراوی، عبور موفقیت آمیز پروبیوتیک از معده و استقرار آن در روده را تضمین می کند [۱۶]. در این مطالعه ۵ جدایه غربال شده توسط آزمایش مقاومت در برابر اسید و نمک صفراوی مورد بررسی قرار گرفتند و سویه‌ها نتایج متفاوتی داشتند ولی دو سویه M3 و Y4 نسبت به سایر سویه‌ها رشد و مقاومت بهتری را در این شرایط از خود نشان دادند. ممکن است سطوح مختلف مقاومت به نمک صفراوی و شرایط اسیدی بستگی به بیان پروتئین‌های خاص باکتریایی [۳۰] و مرتبط با مقاومت صفرا در باکتری‌های اسید لاکتیک داشته باشد [۳۱]. NaCl یک ماده بازدارنده است که ممکن است مانع رشد برخی از انواع باکتریها شود و پروبیوتیک‌ها باید غلظت بالای نمک را در روده انسان تحمل کنند [۳۲]. در این مطالعه سویه‌ها از لحاظ مقاومت به مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج خوبی را نشان دادند. باکتریهای اسیدلاکتیک میتوانند ترکیبات آنتاگونیستی تولید کنند که دارای طیف فعالیتی متفاوتی هستند [۳۳]. داشتن خواص ضد میکروبی از ویژگی‌های مهم پروبیوتیک‌هاست که در مطالعات گذشته، بوریس و همکاران. نشان دادند که سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از محصولات لبنی قادر به جلوگیری از رشد سالمونلا تیفی موریم، سودوموناس انروترینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی هستند [۳۴]. در مطالعه انجام شده نیز تاثیر سویه‌های جدا شده بر روی این پاتوژن‌ها بررسی و نتایج مشابهی مشاهده شد و دو سویه M3 و Y4 تاثیر مھاری بهتری از خود نشان دادند. این توانایی ممکن است به دلیل تولید باکتریوسین‌ها و مکانیزم‌هایی از جمله تولید ترکیبات بازدارنده باکتریایی، انسداد

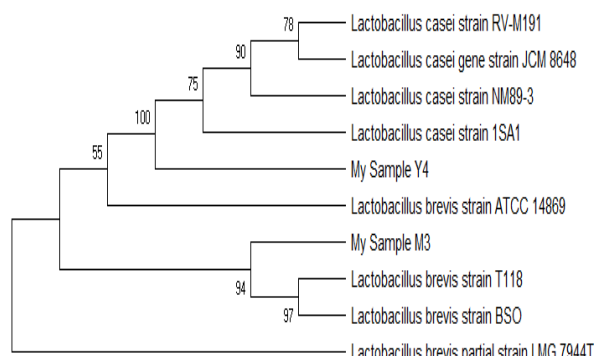


Fig 4 Phylogenetic tree for strains M3 and Y4

۹- بحث

امروزه از مواد و روشهای طبیعی مختلف برای پیشگیری یا درمان بیماریها استفاده میشود. استفاده از پروبیوتیکها یکی از این روشها است. لاکتوباسیلها و بیفیدوباکتریوم‌ها فلور طبیعی روده هستند که با جلوگیری از عفونت روده، کاهش کلسترول، تحریک سیستم ایمنی بدن و کاهش خطر سرطان روده بزرگ نقش مهمی در سلامت انسان ایفا میکنند [۲۵]. باکتریهای پروبیوتیک، اسیدلاکتیک و اسیدهای آلی تولید میکنند، pH محیط را کاهش میدهند و سعی میکنند از رشد بسیاری از باکتریها جلوگیری کنند. این باکتریها ترکیبات ضد میکروبی مانند باکتریوسین تولید میکنند که میتوانند به عنوان نگهدارنده طبیعی استفاده شوند [۲۶]. سالهاست که محصولات لبنی به عنوان محصولات ارزشمند برای سلامت انسان شناخته میشوند [۲۵]. در سالهای اخیر، بسیاری از دانشمندان باکتری‌های اسید لاکتیک و لاکتوباسیلها را از محصولات سنتی در سراسر جهان جدا و شناسایی کرده و اثرات آنتاگونیستی آنها را در برابر عوامل بیماریزای مختلف ارزیابی کرده اند [۲۷]. میکروارگانیسمهایی مانند لاکتوباسیلها و بسیاری از باکتریهای دیگر میتوانند عوامل بیماریزا را از طریق مکانیسمهای متعدد از جمله حذف رقابتی که منجر به ایمنی غذا میشود، از بین ببرند [۲۵]. عرضه محصولات با باکتری‌های زنده پروبیوتیک که به هضم غذا و سلامتی کمک می‌کنند، میزان پذیرش محصولات لبنی را افزایش می‌دهد. با توجه به این امر، صنایع غذایی تقاضای زیادی برای باکتری‌های جدید نامزد پروبیوتیک،

۱۲- منابع

- [1] Minj J, Paul C, Sharma R K. 2020. Bio-functional properties of probiotic *Lactobacillus*: current applications and research perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 61(13):2207-24.
- [2] Bazireh H, Azimzadeh Jamalkandi S, Ahmadiand A, Boroumand M A. 2020. Isolation of Novel Probiotic *Lactobacillus* and *Enterococcus* Strains From Human Salivary and Fecal Sources. *Frontiers in Microbiology*. 11:597946.
- [3] Besser M, Weber L, Ghebremedhin B, Naumova E A, Arnold W H, et al. 2019. Impact of probiotics on pathogen survival in an innovative human plasma biofilm model (hpBIOM). *J Transl Med*. 17:243.
- [4] Reuben R C, Sarkar S L, Rubayet Ul Alam A S M, Jahid I K. 2020. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. *J Dairy Sci*. 103(2):1223-37.
- [5] Edalati E, Alizadeh M, Hosseini SS, Bialvaei AZ, Taheri K. 2019. Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. *New Microbes New Infect*. 27:64-8.
- [6] Khedid K, Mokhtari A, Soulaymani A, Zinedine A. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiol Res*. 164:81-91.
- [7] Dahroud BD, Khiabani MS, Hamishehkar H, Bialvaei AZ, Yousefi M, et al. 2016. Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392. *Int J Biol Macromol*. 86:462-7.
- [8] Ogier J C. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *Int J Food Microbiol*. 126(3):291-301.
- [9] Neuzil Bunesova V, Modrackova N, Vlkova E, Bolechova P, Burtscher J, et al. 2021. Five novel bifidobacterial species isolated from faeces of primates in two Czech zoos: *Bifidobacterium erythrocebi* sp. nov., *Bifidobacterium moraviense* sp. nov., *Bifidobacterium oedipodis* sp. nov., *Bifidobacterium olomucense* sp. nov. and *Bifidobacterium panos* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 71(1):004573.

محل‌های اتصال باکتری‌های پاتوژن، رقابت پروبیوتیک‌ها با باکتری‌های پاتوژن برای جذب مواد مغذی، تولید اسیدهای آلی مانند اسید پروپیونیک، اسید لاکتیک، فنیلیا اسیدهای چرب آزاد توسط پروبیوتیک‌ها باشد [۳۵، ۳۶]. میکروارگانیزم‌های پروبیوتیک باید ایمن باشند، یعنی باکتری‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلها، اساساً ناتوان از ایجاد همولیز و همچنین مایع شدن ژلاتین در بدن میزبان هستند. حساسیت آنتی بیوتیکی و همچنین ویژگی ذاتی مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوباسیلها به تولید محصولات بی خطر پروبیوتیک برای مصرف انسان کمک میکند [۳۷]. نتایج مطالعه انجام شده نشان دهنده مقاومت و حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، کلیندامایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین است. حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سایر مطالعات دیگر نیز برای باکتری‌های پروبیوتیک گزارش شده است [۳۸]. برای به دست آوردن شناسایی دقیق و قابل اطمینان از گونه‌های پروبیوتیک، باید از تکنیک‌های مولکولی استفاده کرد [۳۹] در این مطالعه نیز، علاوه بر استفاده از روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی جهت جداسازی و شناسایی سویه‌ها، از روش مولکولی و توالی‌یابی ژن 16S rRNA برای شناسایی دقیق‌تر سویه‌ها نیز استفاده شد و نتایج نشان داد که جدایه M3 دارای ۱۰۰٪ شباهت به لاکتوباسیلوس برویسو جدایه Y4 دارای ۱۰۰٪ شباهت لاکتوباسیلوس کازئی بود.

۱۰- نتیجه گیری

بر اساس تحقیق انجام شده و نتایج حاصل از بررسی خواص پروبیوتیکی می‌توانیم دو باکتری لاکتوباسیلوس برویسو و لاکتوباسیلوس کازئی جداشده از لبنیات سنتی استان فارس را به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک در نظر گرفته و آنها را در صنایع غذایی مختلف از جمله لبنیات و همچنین جهت ارتقا کیفیت غذای دام و طیور مورد استفاده و بهره برداری قرار دهیم.

۱۱- فهرست واژگان لاتین

LAC: Lactic acid bacteria
MRS: De Man, Rogosa and Shreve
SIM: Sulfide-Indole-Motility
16S Rrna: 16S ribosomal RNA
PCR: Polymerase chain reaction

- [20] Nath S, Roy M, Deb B. 2020. In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. *Food Quality and Safety*.4(4):213-23.
- [21] Noohi N, Rohani M, Talebi M, Pourshafie MR. 2021. Screening for probiotic characters in lactobacilli isolated from chickens revealed the intra-species diversity of *Lactobacillus brevis*. *Animal Nutrition*.7(1):119-26.
- [22] Karakas Sen A. 2018. Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. *Agricultural Sciences*.34(2):385-99.
- [23] Erdourul O. 2006. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. *Turk J Biol*.30:39-44.
- [24] Nomoto R, Tanaka K, Tsujikawa Y, Kusunoki H, Osawa R. 2017. Isolation and identification of *Bifidobacterium* species from feces of captive chimpanzees. *Bioscience of microbiota, food and health*.36(3):91-9.
- [25] Karami S, Hamzavi H, Bahmani M, Hassanzad azar H, Mahmoodnia L, Rafieian Kopaei M. 2017. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *Int J Pharm Investig*.7(3):137-41.
- [26] Aroucheva AA, Faro S. 2001. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infect Dis Obstet Gynecol*.33-9.
- [27] Rossetti L, Gatti M, Lazzi C, Neviani E, Giraffa G. 2008. Grana Padano cheese whey starters: Microbial composition and strain distribution. *Int J Food Microbiol*.127:168-71.
- [28] Colombo M, Eller M, Nero LA. 2018. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. *Journal of Dairy Research*.85(4):487-96.
- [29] Mantzourani I, Bontsidis Ch, Karolidou K, Terpou A, Alexopoulos A, Bezirtzoglou E, Galanis A, Plessas S. 2019. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro experimental systems. *Annals of Microbiology volume*.69:751-63.
- [10] Soccol RC, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, De Dea Lindner L, et al. 2010. The Potential of Probiotics. *Food Technol Biotech*.48(4):413-34.
- [11] Santacroce L, Bottalico L. 2019. A successful history: Probiotics and their potential as antimicrobials. *Expert Rev Anti Infect Ther*.17(8):635-45.
- [12] Mohammed M, Omran N, Anwar S., Awad S. El-Soda, M. 2009. SRep-PCR Characterization and Biochemical Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Delta Area Egypt. *Int J Food Microbiol*.128(3):417-23.
- [13] Partovi R, Akhondzadeh Basti A, Noori N, Nikbakht Borujeni G, Kargozari M. 2015. Microbiological and Chemical Properties of S iahmazgi Cheese, an Iranian Artisanal Cheese: Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria. *J Food Process Pres*.39(6):871-80.
- [14] Parsaeimehr M, Jebellijavan A, Staji H. 2019. The Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria by the Sequencing of the 16S rRNA in Traditional Cheese (Khiki) in Semnan, Iran. *J Hum Environ Health Promot*.5(1):15-20.
- [15] N. D. 2012. The influence of transglutaminasetreatment on functional properties of strained youghrt. *J Anim Vet Adv*.11(13):2238-46.
- [16] Rokhtabnak N, Sasan H A. 2016. Isolation and identification of *Lactobacillus* bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. *Iran J Med Microbiol*.10(1):24-34.
- [17] Narimani T, Tarinejad A, Hejazi M A. 2015. Isolation and biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoi city. *Iranian Journal of Food Science and Technology*.12(48):115-28.
- [18] Yan S, Liu X, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2017. Production of exopolysaccharide by *Bifidobacterium longum* isolated from elderly and infant feces and analysis of priming glycosyltransferase genes. *RSC advances*.7(50):31736-44.
- [19] Hussain SM, Ahmed LA, Udipi M, Sukumaran SK. 2020. Bioprocess development for enhanced production of probiotic *Bifidobacterium bifidum*. *Current Science*.118(2):280.

- against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. *Clinical Nutrition Experimental*. *Clinical Nutrition Experimental*.23(97-115).
- [36] Barbosa AAT, Jain S. 2017.Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. *Critical reviews in biotechnology*.37(7):852-64.
- [37] Halder D, Sekhar Chatterjee Sh, Kumar Pal N, Mandal Sh. 2017.Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicines*.5(2):31.
- [38] Sharma Ch, Thakur N,Pal Singh B, Gupta S, Kaur S, Kumar Mishra S, Kumar Puniya A, Pal Singh Gill J, Panwar H. 2017.Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech*.7(1):53.
- [39] Farahmand N, Naghizadeh Raeisi Sh, Sutherland J, B. Ghoddusi H. 2021.Probiotic Lactobacilli in Fermented Dairy Products: Selective Detection, Enumeration and Identification Scheme. *Microorganisms*. 9(8):1600.
- [30] Yu Z1, Li S, Li C, Li D, Yang Z. 2013.Evaluation of probiotic properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Chinese sauerkraut. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*.29(3):489-98.
- [31] Hamon E, et al. 2011.Comparative proteomic analysis of Lactobacillus plantarum for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC microbiology*.11(1):1-11.
- [32] Prabhurajeshwar Ch. 2017.Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. *Biomed J*.40(5):270-83.
- [33] Ahmed Rushdy A. 2013.Antimicrobial compounds produced by probiotic Lactobacillus brevis isolated from dairy products. *Ann Microbiol*.63:81-90.
- [34] Boris S, Caso JL, Barbes C. 2001.Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. *J Appl Microbiol*.91:328-33.
- [35] Prabhurajeshwar C. 2019.Evaluation of antimicrobial properties and their substances



Isolation and Biochemical and Molecular Identification of Lactobacilli from Traditional Dairy in Fars Province and Investigation of Their Probiotic Potential

Zamani, N. ¹, Akhavan Sepahi, A. ^{2*}, Fazeli, M. R. ³, Shariatmadari, F. ⁴

1. Ph.D. candidate, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Drug and Food Control, School of Pharmacy, Drug Quality Assurance Research Center, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Professor, Department of Animal Sciences, School of Agriculture., Tarbiat modares University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Lactobacilli are the most well-known strains with probiotic properties that have a great effect on promoting gastrointestinal health. The purpose of this study was to isolate and evaluate the probiotic properties of local Lactobacillus in dairy products in Fars province. Gram-positive and catalase-negative bacilli were isolated and analyzed from dairy samples by chemical methods. To evaluate the probiotic properties of the isolates, their growth rate was measured at different acidic and alkaline pHs, different concentrations of bile salt and NaCl salt. The antimicrobial activity of the isolates on pathogenic bacteria was investigated by agar well diffusion method and also susceptibility testing to common antibiotics was performed by disk diffusion method. Optimal strains were identified molecularly by 16 S rRNA gene sequencing. Out of 36 gram-positive and catalase-negative strains, 10 strains were biochemically similar to Lactobacilli that 5 strains being able to grow at pH 3 to 9 and different concentrations of bile salt and NaCl salt. These bacteria had antimicrobial activity against common pathogens and were resistant to the antibiotics Clindamycin, Ampicillin, Erythromycin, and Tetracycline. Strains M3 and Y4 had better probiotic properties. Molecular evaluation showed that these two strains are 100% and 99.98% similar to Lactobacillus brevis and Lactobacillus casei strains, respectively. As a result, it was found that these two strains of Lactobacillus with approved probiotic properties are available in traditional dairy products in Fars province, which can be used in the dairy food industry to improve the quality of livestock and poultry feed.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/09/12
Accepted 2021/12/06

Keywords:

Probiotic,
Lactobacillus,
Isolation,
16S rRNA.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.41

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5

*Corresponding Author E-Mail:
akhavanspahy@gmail.com