مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

جداسازی و شناسایی لاکتیک اسید باکتری‌های غالب در ترشی سیر و بررسی برخی فعالیت‌های پروبیوتیک بالقوه آنها

امیر خدنگ نیکفرجام[1]، الهام مهدیان[1]، ریحانه احمدزاده[1]، رضا کاراژیان[2]

1-گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

2-گروه بیوتکنولوژی صنعتی میکروارگانیسم ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی صنعتی، جهاد دانشگاهی مشهد.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: **1399 /09/11**

تاریخ پذیرش: **1400/05/04**

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

سیر،

اسید لاکتیک باکتری‌ها،

PCR

DOI: 10.22034/FSCT.19.127.385

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.6.9

* مسئول مکاتبات:

Emahdian2000@yahoo.com

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی اسید لاکتیک باکتری‌های غالب در ترشی سیر، با استفاده از آزمون‌های اولیه بیوشیمیایی و به کمک تکنیک PCR و بررسی فعالیت پروبیوتیکی بالقوه آنها می باشد. بدین منظور جهت تعیین پتانسیل پروبیوتیکی جدایه‌های مذکور، آزمایش‌های تأییدی شامل بررسی مقاومت به اسید، مقاومت به شرایط شبیه‌سازی شده معده، مقاومت به نمک‌های صفراوی، فعالیت علیه باکتری‌های بیماری‌زا، حساسیت نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌های رایج و فعالیت همولیتیکی جدایه‌ها انجام گرفت. بر اساس نتایج حاصل از BLAST، پنج جدایه *Lactobacillus plantarum*، دو جدایه به عنوان *Pediococcus ethanolidurans* و یک جدایه به عنوان *Lactobacillus brevis* شناسایی شدند. لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده در این مطالعه توانایی زنده‌مانی در pH 2/5، رشد در محیط حاوی 0/3 درصد نمک صفراوی، حساس به آنتی‌بیوتیک‌ها و فاقد فعالیت همولیتیکی بودند به همین دلیل دارای خواص پروبیوتیکی هستند. همچنین روماند جدایه‌های این پژوهش در غلظت‌های بالا توانایی مهار رشد و نیز قدرت کشندگی بر باکتری‌های بیماری‌زا را داشتند. در نهایت جدایه‌های این پژوهش می‌توانند در آینده به عنوان سویه دارای پتانسیل پروبیوتیک به محصولات دیگر نیز افزوده شوند.

1- مقدمه

شناسایی باکتری‌ها بر اساس ویژگی‌های مختلف نظیر مورفولوژی و کلنی، شرایط کشت، حرکت، توانایی تولید اسپور و الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها انجام می‌شود. اما امروزه مشخص‌شده که شناسایی باکتری‌ها صرفا بر مبنای خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی چندان دقیق نبوده، به‌گونه‌ای که در بسیاری از موارد، دسته‌ای از باکتری‌هایی که برمبنای این خصوصیات در یک گروه قرار می‌گیرند از نظرخصوصیات ژنوتیپی با یکدیگر تفاوت‌های زیادی دارند[1].

دانش موجود در خصوص میکروارگانیسم‌های دخیل در تخمیر بسیاری از سبزی‌ها هنوز به داده‌های حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی کلاسیک وابسته است. در حال حاضر به کارگیری روش‌های مولکولی در زمینه شناسایی میکروارگانیسم‌ها امکان درک بهتر بوم‌شناسی تخمیرهای غذایی را فراهم آورده است. امروزه تکنیک‌های ژنوتیپی مختلف بسیاری به عنوان ابزاری برای شناسایی گونه‌ها و تمایز بین جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری‌ها به‌کار می‌روند[2].

خانواده لاکتیک اسید باکتری‌ها از یک گروه متنوع از باکتری‌های گرم مثبت و بدون اسپور تشکیل‌شده است. آنها ممکن است به‌صورت میله‌ای یا کروی باشند و غالباً فاقد کاتالاز هستند.البته در موارد نادر شبه کاتالاز دیده می‌شوند. شیمیوارگانوتروف بوده و در محیط‌های پیچیده رشد می‌کنند[3].

محصولات تخمیری سیر سرشار از اسید باکتری‌ها است که در طی فرآوری آن اثرات مفیدی در محصول ایجاد می‌کنند[4]. لاکتیک اسید باکتری‌ها میکروارگانیسم‌های اصلی مورد استفاده برای تولید محصولات غذایی تخمیری سنتی و جدید می‌باشند، آن‌ها هم مسئول حفاظت و هم مسئول ویژگی‌های حسی محصول نظیر رنگ، طعم و بافت آن هستند. Lactobacillus plantarumنقش مهمی در تخمیر و فرآوری محصولات تخمیری سبزیجات ایفا می‌کند. این باکتری تاریخچه‌ای طولانی از مصرف ایمن و طبیعی در انواع محصولات غذایی دارد. انواع گونه‌های L. plantarum توانایی ایجاد التهاب ندارند و نسبت به اسید معده و نمک‌های صفراوی مقاوم‌اند، بنابراین پتانسیل بالقوه‌ای در معرفی به‌عنوان سویه پروبیوتیک دارد[5].

سیر با نام علمی *Allium sativum*، گیاهی از تیره‌ی پیازها (Asparagales) و سرده‌ی سیرها (Allium) با دوره زندگی دو ساله یا چند ساله است که اولین بار در آسیای مرکزی کشت شده و قرن هاست که به عنوان ادویه، سبزی و داروی گیاهی از مناطق مدیترانه‌ای تا آسیای مرکزی استفاده می‌شود. ترشی سیر بین ترشی‌های مورد مصرف در ایران تقاضای بالایی دارد. این موضوع می‌تواند به دلایل ارگانولپتیکی و یا اثرات مفید بر سلامتی گزارش شده سیر مربوط باشد. بر خلاف سایر محصولات بر پایه سیر، که عملکرد اصلی آنها تأمین عطر و طعم تند خاصی است که توسط ترکیبات گوگرد فرار ارائه می‌شود، به دلیل غیرفعال شدن آنزیم آلیناز، سیر ترشی عاری از این طعم تند است [20]. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی اصلی در سیر ترشی و بررسی خصوصیات پروبیوتیکی بالقوه آنها بود.

2- مواد و روش

2-1- تهیه نمونه‌ها

ترشی سیر 7 ساله از بازار محلی قوچان تهیه شد.

2-2- اندازه‌گیری pH و اسیدیته

تغییرات pH به کمک pH متر و اسیدیته بر طبق روش تیتراسیون بر اساس استاندارد اندازه‌گیری گردید. درصد اسیدیته بر حسب اسید لاکتیک به روش تیتراسیون با سود 0/1 نرمال در مجاورت فنل فتالئین طبق فرمول زیر محاسبه شد.

$$\%titratable\ acidity = \frac{N \times 0/009 \times 100}{S}$$

S sample taken in (ml), N the amount of NaOH consumed in (ml)

2-3- جداسازی لاکتیک‌اسید باکتری‌ها

10 گرم از نمونه در شرایط استریل به درون کیسه مخصوص استومکر ریخته و به هر کیسه 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده و هر کیسه به مدت 5 دقیقه با دور 260 rpm مخلوط و رقت‌های بعدی (رقت 10^{-2} تا رقت 10^{-4}) تهیه شد و در شرایط بی‌هوازی در جار و گاز پک در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس کشت خطی از کلنی‌ها تهیه و پس از رنگ آمیزی گرم بر روی آنها تست کاتالاز انجام شد[6].

2-4- استخراج DNA از جدایه‌ها

از کشت 24 ساعته در 37 درجه سانتی‌گراد جهت تهیه سوسپانسیون اولیه استفاده گردید. جهت استخراج DNA جدایه‌ها، از کیت استخراج DNA استفاده و همه مراحل مطابق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت[7].

2-5- انجام PCR

برای هر مخلوط واکنش 30 میکرولیتر حجم در نظر گرفته شد که اجزای آن در جدول 1 آورده شده است. جهت تعیین توالی ژن 16S rRNAدر جدایه‌هایی که DNA آنها استخراج‌شده،

از پرایمرهای رفت 27F و برگشت 1492R استفاده گردید[7]. پس از اختلاط اجزای واکنش PCR (جدول 2) در میکروتیوب 0/2 میکرولیتر، تکثیر ژن با برنامه دمایی مندرج در جدول (3) صورت گرفت[8 و 9].

Table 1 Nucleotide sequence of primers used in this study

Primer name	Nucleotide sequences
Forward Primer	GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG
Reverse Primer	GAA AGG AGG TGA TCC AGC CG

Table 2 Specifications of PCR reaction components

Components of the reaction	Volume used (micro liters)
Master Mix	11/25
DNA template	3
Forward Primer	2/25
Reverse Primer	2/25
double distilled water	11/25
Total	30

Table 3 Thermocycler program used for PCR

Program	Step	Temperature (˚C)	Time	
1	Initial denaturation	95	5 min	
2	Denaturing	94	30 s	33 cycles
	Annealing	54	30 s	
	Extending	72	2 s	
3	Final extending	72	10 min	

2-6- الکتروفورز محصولات PCR

پس از انجام واکنش PCR، برای هر واکنش 3 میکرو لیتر از محصول واکنش به همراه 1 میکرو لیتر رنگ بارگذاری[1] و 2 میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر در هر چاهک الکتروفورز بارگذاری شد. الکتروفورز مخلوط‌های بارگذاری شده در ژل آگارز 1/5 درصد حاوی 1 میکرو لیتر Safe Stain و در بافر TBE 1X با جریان90 ولت، به مدت 45 دقیقه انجام پذیرفت. سپس تحت اشعه‌ی ماوراءبنفش عکس‌برداری از باندها صورت گرفت[10].

2-7- تعیین توالی جدایه‌ها

جهت تعیین توالی به‌صورت خوانش یک طرفه از پرایمر 27F، به شرکت Macrogen کره ارسال گردید. سپس توالی‌های به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)، BLAST شده و مشابه‌ترین گونه به جدایه‌ی موردنظر تعیین شد. تشابه بالای 97 درصد به‌عنوان تشابه معنی‌دار تلقی گردید[10].

2-8- بررسی قابلیت پروبیوتیکی جدایه‌ها

2-8-1- بررسی مقاومت جدایه‌ها به شرایط شبیه‌سازی شده معده و شرایط اسیدی

برای این منظور 3/2 گرم/لیتر پپسین و 2 درصد Nacl در MRS براث حل شده و توسط HCl به pHهای 1/5، 2، 2/5 و 3 تنظیم گردید. 1 میلی‌لیتر از MRS براثی که جدایه‌ها در شب قبل در آن تلقیح و گرمخانه شده برداشته و به 19 میلی‌لیتر از محیط شبیه‌سازی شده معده با pHهای متفاوت اضافه شد و بعد گرمخانه‌گذاری در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 0/5، 1، 1/5 و 2 ساعت، زنده‌مانی باکتری‌ها توسط کشت روی MRS آگار مورد بررسی قرار گرفت[11].

در بررسی میزان مقاومت و زنده‌مانی جدایه‌ها به شرایط اسیدی بعد از قرار گرفتن در محیط کشت MRS براث با pH=2/5 به مدت دو ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد شمارش انجام شد[12]. در انجام هر دو آزمون، نمونه کنترل برای هر گونه در MRS براث با pH 6/5 (pH اولیه محیط کشت) به همان اندازه تلقیح و در شرایط مشابه گرمخانه‌گذاری گردید.

2-8-2- بررسی مقاومت جدایه‌ها به نمک صفراوی

جدایه‌های تهیه شده به مقدار 100 میکرولیتر روی MRS آگار که مخلوط شده با درصدهای متفاوت از نمک صفراوی با غلظت 1 تا 6 درصد (با افزایش 1 درصد) کشت سطحی داده شده و در 37 درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری و بعد از گذشت 72 ساعت رشد آن‌ها مشاهده گردید[13].

2-8-3- بررسی مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک

مقاومت جدایه‌های لاکتیکی شناسایی شده در برابر 9 آنتی-بیوتیک شامل ((10 mcg) streptomycin، (30 mcg) vancomycin، (30 chloramphenicol

1. Loading dye

gentamycin (10 mcg)، penicillin (10 mcg)، ampicillin (10 mcg)، kanamycin (30 mcg)، erythromycin (15 mcg)، tetracycline (30 mcg) (mcg) بر اساس روش انگمو و همکاران (2016) مورد ارزیابی قرار گردید[7]. بدین منظور از کشت باکتری در MRS براث کدورت 10^8cfu/ml تهیه و 100 میکرولیتر از آن روی MRS آگار کشت سطحی داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی سطح پلیت قرار گرفت و پلیت‌ها به مدت 24 ساعت در 37 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردید. در پایان این زمان، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد[13].

2-8-4- بررسی فعالیت همولیتیکی جدایه‌ها

لاکتیک اسید باکتری‌های شناسایی شده روی محیط کشت آگار خون‌دار که ترکیب شده با 7 درصد خون دیفیبرینه گوسفند

است کشت خطی داده و در 37 درجه سانتی‌گراد در دو شرایط هوازی و بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از گذشت 48 ساعت ویژگی‌های β همولیز (اطراف پرگنه منطقه شفافی ایجاد می‌گردد)، α همولیز (اطراف پرگنه هاله سبز رنگ ایجاد می‌گردد) و γ همولیز (باکتری فاقد آنزیم همولیزین می‌باشد) مورد مشاهده قرار گرفت[14].

2-9- تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوش با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه 16 و به روش کاملا تصادفی، تجزیه و تحلیل آماری صورت می‌گیرد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن با درصد خطای 5 درصد استفاده شد . نمودارها با کمک نرم‌افزار اکسل تهیه و آنالیز گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- نتایج حاصل از توالی‌یابی محصولات PCR

نتایج توالی‌یابی محصولات PCR با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI، منجر به شناسایی جدایه‌های مورد نظر شد. بر این اساس، جدایه‌هایی که دارای بیشترین هم‌پوشانی و مشابهت با توالی‌های مذکور بودند در جدول 4 ارائه شده است.

با توجه به نتایج توالی‌یابی، از گونه‌های *Lactobacillus plantarum*، *Pediococcus ethanolidurans* و *Lactobacillus brevis* می‌توان به عنوان گونه‌های اسید لاکتیک باکتری غالب ترشی سیر نام برد. . این جدایه‌ها برای شناسایی بیشتردر مرحله مولکولی از PGNM1 تا PGNM8کدگذاری شد(حروف PG، N وM به ترتیب از اسامی Pickled Garlic، Nikfarjam و Mahdian مستخرج شده است).

Table 4 Lactic isolates identified from pickled garlic

Well	[1]Isolation identification code	Identified species similar	Race	Percentage of similarity
3	PGNM1	*Lactobacillus brevis*	FJ006	97
4	PGNM2	*Lactobacillus plantarum*	CSCWL	98
5	PGNM3	*Pediococcus ethanolidurans*	BGM6	86
6	PGNM4	*Lactobacillus plantarum*	S3	97
7	PGNM5	*Lactobacillus plantarum*	CS17	97
8	PGNM6	*Pediococcus ethanolidurans*	IMAU80061	97
9	PGNM7	*Lactobacillus plantarum*	ex28	92
10	PGNM8	*Lactobacillus plantarum*	KLDS	97

1.PG, N and M are derived from the names Pickled Garlic, Nikfarjam and Mahdian, respectively

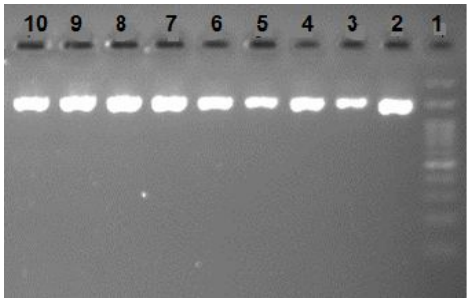

Fig 1 electrophoresis of PCR products

روش‌های اولیه شناسایی باکتری‌ها شامل روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی نمی‌تواند به تنهایی برای شناسایی دقیق باکتری‌ها به کار رود. امروزه روش‌های شناسایی مولکولی باکتری‌ها در کنار روش‌های بیوشیمیایی، برای شناسایی دقیق در حد گونه و نژاد استفاده می‌شوند. تحقیقات متعدد در دنیا، روش‌های مولکولی را برای شناسایی انواع مختلف باکتری‌ها از جمله لاکتیک اسید باکتری‌ها به کار گرفته‌اند.

تاکنون پژوهش‌های زیادی مبنی بر شناسایی گونه‌های عامل تخمیر فراورده‌های تخمیری صورت گرفته است. هورتادو و همکاران (2012) طی تحقیقاتی که انجام دادند بیان کردند باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus pentosus* از گونه‌های غالب در تخمیر

زیتون هستند [5]. همانند نتیجه این پژوهش *Lactobacillus plantarum* توسط دلگادو و همکاران (2001)؛ کاسم و کارام (2005) و سانچز و همکاران (2001) گونه غالب در تخمیر زیتون معرفی شد [15، 6 و 16].

در پژوهش انجام شده با رشد جدایه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی (MRS) همچنین گرم مثبت و کاتالاز منفی بودن آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های جداشده از ترشی سیر از دسته لاکتیک اسید باکتری‌ها هستند[5].

از بین جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش 4 جدایه *L. plantarum* PGNM2، *L. plantarum* PGNM8، *P. ethanolidurans* PGNM6 و *L. brevis* PGNM1 برای انجام ادامه پژوهش انتخاب شدند.

3-2- بررسی توان پروبیوتیکی جدایه‌ها

3-2-1- بررسی مقاومت جدایه‌ها به شرایط شبیه‌سازی شده معده

بررسی بقای باکتری‌ها در سیستم گوارشی یکی از مهم‌ترین فاکتورها در انتخاب جدایه‌های پروبیوتیک است. مقاومت در برابر اسید و صفرا، دو ویژگی اساسی به منظور پیش‌بینی توانایی باکتری برای عبور از دستگاه گوارش است.

در این پژوهش با شبیه‌سازی شرایط معده و قابلیت زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی شناخته شده (جدول 5) مشاهده شد که تمام جدایه‌ها شرایط زنده‌مانی در pHهای 1/5، 2 و 3، در مدت زمان 0/5، 1 و 1/5 ساعت را دارند و غیر از دو جدایه *L. brevis* PGNM1 و *P. ethanolidurans* PGNM6 دو جدایه دیگر توانایی زنده ماندن در pH 1/5 به مدت 2 ساعت را داشتند.

3-2-2- بررسی مقاومت جدایه‌ها به محیط اسیدی

به منظور پی بردن به تغییر جمعیت جدایه‌ها در محیط اسیدی با pH 2/5 بعد از قرارگیری در محیط اسیدی شمارش جدایه‌ها در لحظه 0 و 2 ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری انجام شد (جدول 6) نتایج نشان داد که *L. plantarum* PGNM2 و *L. plantarum* PGNM8 کاهش جمعیتی تقریباً معادل یک سیکل لگاریتمی داشت جدایه *L. brevis* PGNM1 سه سیکل لگاریتمی و جدایه *P. ethanolidurans* PGNM6 چهار سیکل لگاریتمی کاهش داشت.

Table 5 Resistance of the LAB to simulated gastric condition

LAB isolate	Time (h)	Pepsin at pH 3	Pepsin at pH 2.5	Pepsin at pH 2	Pepsin at pH 1.5
L. plantarum PGNM2	0.5	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
L. plantarum PGNM8	0.5	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+
	2	+	+	+	+
L. brevis PGNM1	0.5	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+
	2	+	+	+	−
P.ethanolidurans PGNM6	0.5	+	+	+	+
	1	+	+	+	+
	1.5	+	+	+	+
	2	+	+	+	−

+,Isolation survival ability, - Isolation survival inability

Table 6 Changes in the population of isolates in acidic conditions with pH 2.5

LAB isolates	Ph 2/5	
	log cfu mL^{-1} (0 h)	log cfu mL^{-1} (2 h)
L. plantarum PGNM2	7/2±0/68	6/3 ± 0/46
L. plantarum PGNM8	7/9±0/49	6/5±0/38
L. brevis PGNM1	7/4±0/11	5/3±0/47
P. ethanolidurans PGNM6	8/2±0/13	4/7±0/37

در مجموع تمام جدایه‌ها توانایی بقا در شرایط اسیدی را داشتند ولی مقاوم‌ترین جدایه *L. plantarum* PGNM2 بود.

مطابق نظر دلگادو و همکاران (2007) شرایط اسیدی با pH=2/5 برای باکتری‌ها مخرب است ولی گونه‌های لاکتیکی باید توانایی بقا در این شرایط را داشته باشند که در این پژوهش جدایه‌ها به این شرایط مقاوم بودند و در بین جدایه‌ها *P.ethanolidurans* PGNM6 کمترین مقاومت را به

شرایط اسیدی نشان داد [17].

3-2-3- بررسی مقاومت جدایه‌ها به نمک صفراوی

کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می‌کند و اثر بازدارندگی آن بیشتر به وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. باور بر این است که در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی 0/3 درصد وزنی/حجمی است. در نتایج خوانش جذب در طول موج 600 نانومتر بعد از 24 ساعت گرم‌خانه‌گذاری جدایه‌ها در این غلظت نمک صفراوی، مشاهده شد تمام جدایه‌ها به این محیط نه تنها مقاوم‌اند بلکه توانایی رشد تقریباً برابر با نمونه شاهد (محیطی بدون نمک صفراوی) را داشتند (جدول 7).

Table 7 Isolation resistance of bile salts (0.3%)

LAB isolates	Absorption at 600 nm	
	Bile salt 0.3% log cfu mL^{-1}	Control log cfu mL^{-1}
L. plantarum PGNM2	1/34±0/08	1/27±0/11
L. plantarum PGNM8	1/41±0/1	1/44±0/33
L. brevis PGNM1	1/26±0/09	1/31±0/06
P.ethanolidurans PGNM6	1/11±0/08	1/21±0/31

در بررسی میزان مقاومت جدایه‌ها به غلظت‌های بالای نمک صفراوی (جدول 8)، مشاهده شد تمام جدایه‌های لاکتیکی قادر به تحمل غلظت 3 درصد نمک صفراوی بودند. L. plantarum PGNM2 به خوبی توانایی رشد و هیدرولیز محیط حاوی 6 درصد نمک صفراوی را داشت. در حالی که جدایه P.ethanolidurans PGNM6 توانایی رشد در محیطی با نمک صفراوی 4 درصد را نداشت.

Table 8 Ability of isolates to grow at high concentrations of bile salt (weight / volume)

LAB isolate	1%	2%	3%	4%	5%	6%
L. plantarum PGNM2	+	+	+	+	+	+
L. plantarum PGNM8	+	+	+	+	+	–
L. brevis PGNM1	+	+	+	+	+	–
P. ethanolidurans PGNM6	+	+	+	–	–	–

+,Isolation survival ability, - Isolation survival inability.

مطابق پژوهش‌های گزارش شده نمک صفراوی، حتی درغلظت‌های پایین، می‌تواند مانع از رشد میکروارگانیسم‌ها و بقای آنها شود. همچنین گزارش شده 0/3 درصد غلظت بحرانی برای آزمایش مقاومت جدایه‌ها است [7 و 13]. مقاومت جدایه‌ها در محیط کشت MRS آگار حاوی درصدهای مختلف نمک صفراوی نشان داد توانایی زنده ماندن و رشد جدایه *L. plantarum* PGNM2 از سه جدایه دیگر بیشتر است و فقط این جدایه توانایی رشد در محیطی با غلظت 6 درصد نمک صفراوی را داشت و حساس‌ترین جدایه به شرایط نمک صفراوی *P. ethanolidurans* PGNM6 بود که تا غلظت 3 درصد نمک صفراوی قابلیت رشد و زنده‌مانی داشت. ابریول و همکاران (2012) به بررسی خصوصیات لاکتیک اسید باکتری‌های جداشده از زیتون تخمیری پرداختند [18]. آنها در بررسی بقای گونه‌ها در محیط حاوی غلظت‌های بالای نمک صفراوی بیان نمودند بعضی از نژادهای *L. pentosus* و *L. pseudomesenteroides* توانایی رشد و هیدرولیز محیط حاوی 3 درصد نمک صفراوی را دارند ولی هیچ یک قادر به رشد در غلظت‌های بیشتر نمک صفراوی نبودند. آنها همچنین، در بررسی زنده‌مانی گونه‌ها در محیط اسیدی مانند پژوهش حاضر (pH 1/5، 2، 2/5 و 3) پس از 30 دقیقه گرمخانه‌گذاری، بیان نمودند که تعداد نژادهای هر دو جدایه به محیط‌های اسیدی (pH 2، 2/5 و 3)، مقاوم‌اند و فقط تعداد کمی از نژادهای *L. pentosus* و جدایه *L. pseudomesenteroides* توانایی بقا درpH 1/5 را داشتند.

3-2-4- بررسی حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها

اگرچه لاکتیک اسید باکتری‌ها به طور کلی GRAS[1] شناخته شده‌اند اما نشان داده شده است که ژن‌های مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند در باکتری‌ها میان جنس‌های مختلف منتقل شده و در نتیجه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم سازند. نتایج حاصل از آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول 9 نشان داده شده است.

1.Generally Recognized As Safe

Table 9 The sensitivity of the LAB isolates to different antibiotics

LAB isolates / Antibiotics	*L. plantarum* PGNM2	*L. plantarum* PGNM8	*L. brevis* PGNM1	*P. ethanolidurans* PGNM6
K	++	++	++	++
GM	+	+	+	+
AM	+	+	+	+
E	+	+	+	+
TE	+	+	+	+
S	++	+	++	++
P	+	+	+	+
C	+	+	+	+
V	+++	+++	+++	+++

+ Sensitive, ++ Semi-sensitive, +++ Resistant
(k)kanamycin, (GM)gentamycin, (AM) ampicillin, (E) erythromycin, (TE) tetracycline, (S) streptomycin, (P) penicillin, (C) chloramphenicol, (V) vancomycin

چهار باکتری لاکتیکی شناسایی شده در این پژوهش به آنتی‌بیوتیک‌های streptomycin و kanamycin نیمه حساس و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بودند. همچنین، هر چهار جدایه نسبت به آنتی‌بیوتیک vancomycin مقاوم بودند. دلیل مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک vancomycin را می‌توان عدم وجود دی آلانین-D- لاکتات[1] در دیواره سلولی این جدایه‌ها دانست. بنابراین مکانیسم‌های مقاومت در میان این جدایه احتمالاً ذاتی و درونی است و این جدایه قادر به انتقال ژن مقاومت نیست [1].

3-2-5- ارزیابی فعالیت همولیتیکی جدایه‌ها

تمام جدایه‌های شناسایی شده در این پژوهش فاقد فعالیت همولیتیکی بودند.

به منظور یافتن بهترین گونه‌های دارای قابلیت پروبیوتیکی تاکنون تحقیقات بسیاری انجام گرفته است. مانینی و همکاران (2016) به بررسی خصوصیات لاکتیک اسید باکتری‌های جداشده از خمیر ترش (دو نژاد از *L. brevis*، چهار نژاد از *L. plantarum* و دو نژاد از *P. pentosaceus*) پرداختند [12]. در انجام آزمون مقاومت به آنتی‌بیوتیک تمام گونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های erythromycin، clindamycin، tetracycline، streptomycin، kanamycin، gentamicin، neomicyn، ampicillin، chloramphenicol حساس گزارش شدند. مانند پژوهش حاضر جدایه‌ها در برابر آنتی بیوتیک vancomycin مقاوم گزارش شدند. در انجام آزمون بقا در شرایط اسیدی و نمک صفراوی توسط این پژوهشگران سه نژاد *L. plantarum* به شرایط اسیدی حساس بودند و بعد از 2 ساعت قرارگیری در pH=2/5 از بین رفتند ولی همه نژادهای *L. brevis* و *P. pentosaceus* و یکی از نژادهای *L. plantarum* توانایی زنده ماندن در این شرایط را داشتند. تمام جدایه‌ها غیر از یکی از نژادهای *P. pentosaceus* در شرایط 0/3 درصد نمک صفراوی قابلیت زنده‌مانی و رشد داشتند. در پژوهش ما نیز هر چهار جدایه لاکتیکی توانایی بقا در شرایط ذکر شده را داشتند.

انگمو و همکاران (2016) به بررسی خصوصیات پروبیوتیک لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده از محصول تخمیری سنتی پرداختند[7]. در ارزیابی مقاومت گونه‌ها به شرایط اسیدی معده (pH=2 و 3)، چندین نژاد از *L. brevis* و *L. plantarum* به این شرایط مقاوم و توانایی زنده‌ماندن بعد از 3 ساعت گرم‌خانه‌گذاری در این pH را داشتند ولی جمعیت آن‌ها 2 تا 4 سیکل لگاریتمی کاهش داشت. در ارزیابی مقاومت گونه‌ها در محیط حاوی 0/5-1 درصد نمک صفراوی بعد از سه ساعت گرم‌خانه‌گذاری مشاهده کردند تمام نژادهای دو گونه قابلیت زنده‌مانی در این محیط را دارند. در بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها بیان کردند که همه گونه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آزمون شده (ampicillin، co-trimoxazole، clindamycin، pencillin) حساس و تنها به آنتی‌بیوتیک vanomycinمقاوم بودند. آنها همچنین، در بررسی آزمون همولیتیک بیان نمودند که هیچ کدام از جدایه‌ها فعالیت همولیتیکی نداشتند. نتایج این پژوهشگران با نتایج این پژوهش روی دو نژاد از *L. plantarum* و *L. brevis* تقریباً یکسان مشاهده شد. ماراگ کوداکیس و همکاران (2006) توان پروبیوتیکی سویه‌های *Lactobacillus* جدا

1. D-Ala-D-lactate

شده از محصولات لبنی را بررسی نمودند از بین آنها *L. plantarum* به محیطی با pH=1 بعد از یک ساعت مقاوم بود و جمعیت اولیه آنها سه سیکل لگاریتمی کاهش یافت و در شرایط وجود پپسین با pH=2 و گرم‌خانه‌گذاری به مدت 3 ساعت، نتایج محققین مذکور نشان داد که این جدایه توانایی زنده ماندن در این شرایط را دارد به شرطی که جمعیت اولیه آن مناسب باشد [19]. در انجام آزمون مقاومت به نمک صفراوی 0/3 درصد در محیط MRS براث و هیدرولیز نمک صفراوی در محیط MRS آگار حاوی 0/5 درصد نمک صفراوی به مدت 48 ساعت گرم‌خانه‌گذاری نشان دادند که این گونه توانایی رشد و هیدرولیز نمک صفراوی را دارد. این گونه گاما همولیتیک گزارش شد و در بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها، حساس به tetracycline معرفی شد. در پژوهش ما نیز دو نژاد *L. plantarum* مقاوم به محیط حاوی پپسین در pH 2/5 و نمک صفراوی مشاهده شدند ولی دو نژاد این جدایه بر خلاف نتایج این پژوهشگران حساس به آنتی‌بیوتیک tetracycline مشاهده شدند.

4- نتیجه‌گیری

جدایه‌های غالب ترشی سیر *L. brevis* ،*L. plantarum* *Pediococcus ethanolidurans* بودند. لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده در این مطالعه توانایی زنده‌مانی در pH 2/5، رشد در محیط حاوی 0/3 درصد نمک صفراوی، حساس به آنتی‌بیوتیک‌ها و فاقد فعالیت همولیتیکی بودند به همین دلیل دارای خواص پروبیوتیکی هستند. رومانند جدایه‌ها نیز در غلظت‌های بالا توانایی مهار رشد و نیز قدرت کشندگی بر باکتری‌های بیماری‌زا را داشتند.

5- منابع

[1] Ammor, M.S., Flórez, A.B., and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology, 24: 559-570.

[2] Mortazavi, A., Bahrami, AR, Sadeghi, A. And Sadeghi, b. (Translation). 2011. Molecular techniques in microbial ecology of fermented foods. Cucoline, L .; And Erkolini, a. Ferdowsi University of Mashhad Publications, pp. 211-195.

[3] Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O., and Yadav, H. 2008. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. Journal of Digestive Diseases, 9: 190-198.

[4] Lavermicocca, P., Valerio, F., Lonigro, S.L., Baruzzi, F., Morea, M., and Gobbetti, M. 2002. Olive fermentations using lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and olive brines. Acta horticulturae.

[5] Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., and Rozès, N. 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. Food Microbiology, 31: 1-8.

[6]Kacem, M., Zadi-Karam, H., and Karam, N.E. 2005. Isolation of lactic acid bacteria from naturally fermented Algerian olives. Journal of King Saud University, 18: 89-98.

[7] Angmo, K., Kumari, A., and Bhalla, T.C. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT-Food Science and Technology, 66: 428-435.

[8] Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I., and Lozo, J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology,112: 230-23.

[9] Van Hoorde, K., Verstraete, T., Vandamme, P., and Huys, G. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. Food Microbiology, 25: 929-935.

[10] Zanirati, D.F., Abatemarco, M., De Cicco Sandes, S.H., Nicoli, J.R., Nunes, Á.C., and Neumann, E. 2015. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. Anaerobe, 32: 70-76.

[11] Millette, M., Cornut, G., Dupont, C., Shareck, F., Archambault, D., and Lacroix, M. 2008. Capacity of human nisin-and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. Applied and Environmental Microbiology, 74: 1997-2003.

[12] Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., and Plumed-Ferrer, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. LWT-Food Science and Technology, 66:

275-283.
[13] Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., Wang, Y., and Zhang, H. 2010. Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products. Food Control, 21: 695-701.
[14] Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., and Tsakalidou, E. 2008. Lactobacillus fermentum ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. International Journal of Food Microbiology, 121: 18-26.
[15] Delgado, A., Brito, D., Fevereiro, P., Peres, C., and Marques, J.F. 2001. Antimicrobial activity of L. plantarum, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. Le Lait, 81: 203-215.
[16] Sánchez, A.H., Rejano, L., Montaño, A., and De Castro, A. 2001. Utilization at high pH of starter cultures of lactobacilli for Spanish-style green olive fermentation. International Journal of Food Microbiology, 67: 115-122.
[17] Delgado, S., O'sullivan, E., Fitzgerald, G., and Mayo, B. 2007. Subtractive screening for probiotic properties of Lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. Journal of Food Science, 72: 310-315.
[18] Abriouel, H., Benomar, N., Lucas, R., and Gálvez, A. 2011. Culture-independent study of the diversity of microbial populations in brines during fermentation of naturally-fermented Aloreña green table olives. International Journal of Food Microbiology, 144: 487-496.
[19] Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. International Dairy Journal, 16: 189-199.
[20] Ahmadabad, N.H., Roudbary, M., Roudbar Mohammadi, Sh., Hassan, Z.M., Firizi, M.N. 2013. Anti-fungal effect of fresh, aged and pickled garlic aqueous extract on Candida albicans; In vitro. Quarterly of the Horizon of Medical Sciences, 18(4): 179-183.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Isolation and Lactic Identification of Dominant Bacteria in Garlic Pickled and Investigation of Some Potential Probiotic Activities

Khadang Nikfarjam, A. [1], Mahdian, E. [1*], Ahmadzadeh Ghavidel, R. [1], Karazhyan, R. [2]

1. Department of Food Science and Technology, Quchan branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
2. Industrial Microbial Biotechnoogy Department, Institute of Industrial Biotechnoogy, ACECR, Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2020/ 12/ 01
Accepted 2021/ 07/ 26

Keywords:

Probiotics,
Garlic,
Lactic acid bacteria,
PCR.

DOI: 10.22034/FSCT.19.127.385
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.127.6.9
*Corresponding Author E-Mail:
emahdian2000@yahoo.com

ABSTRACT

The aim of this study was to identify the lactic acid of the dominant bacteria in pickled garlic, using initial biochemical tests and PCR technique and to investigate their potential probiotic potential. For this purpose, to determine the probiotic potential of these isolates, some confirmatory tests including resistance to acid, resistance to simulated gastric conditions, resistance to bile salts, activity against pathogenic bacteria, susceptibility to some common antibiotics and hemolytic activity of isolates were performed. Based on BLAST results, five isolates of *Lactobacillus plantarum*, two isolates as *Pediococcus ethanolidurans* and one isolate as *Lactobacillus brevis* were identified. The lactic acid bacteria isolated in this study had the ability to survive at pH 2.5, grow in medium containing 0.3% bile salt, were sensitive to antibiotics and lacked hemolytic activity and therefore have probiotic properties. Supernatant of isolates of this study in high concentrations had the ability to inhibit growth of pathogenic bacteria and the lethal activity against them. Finally, the isolates of this study can be added to other products in the future as a strain with probiotic potential.