مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۲، شماره ۲ (شماره پیاپی ۴۷)، تابستان ۱۳۸۸، ۲۷-۱۷

توانایی آنتاگونیسم لاکتوباسیل‌های مقاوم به اسید و صفرا جدا شده از محصولات لبنی

دکتر مریم تاج‌آبادی ابراهیمی[1*]، دکتر محمد امین حجازی[2]، رضا غفاری[3]، دکتر پروانه جعفری[4]

۱- استادیار ، دکترا میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی ، تهران، ایران

۲- استادیار پژوهشی، دکترا صنایع غذایی، موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی تبریز، تبریز، ایران

۳- کارشناس ارشد کشاورزی ، موسسه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج،کرج ، ایران

۴- استادیار، دکترا میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت ۸۷/۸/۱۴، تاریخ پذیرش ۸۸/۴/۱۷

چکیده

مقدمه: هدف این بررسی مطالعه فعالیت ضد میکروبی ۲۲ سویه لاکتوباسیل مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی جدا شده از محصولات لبنی تخمیری لیقوان و شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی سویه‌های منتخب به‌منظور انتخاب سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیک بومی است.

روش کار: در یک مطالعه بنیادی- کاربردی ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی این سویه‌ها با دو روش دولایه و حفره‌ای علیه باکتری‌های بیماری‌زا اشرشیا کلی، لیستریا اینوکوا، یرسینیا انتروکولیتیک، لیستریا مونوسایتوژن و استافیلوکوک اورئوس انجام گرفت. شناسایی این سویه‌ها با دو روش بیوشیمیایی و تعیین ترادف ناحیه ۱۶S rDNA صورت گرفت.

نتایج: در روش دولایه براساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده، سویه‌های مورد آزمایش در سه گروه بازدارنده، نیمه بازدارنده و غیر بازدارنده قرار گرفتند. در روش حفره‌ای اطراف چاهک‌های حاوی عصاره اسیدی سویه‌های *C5i4,Y1l4,K2l3,C4i2,C6l2* و عصاره خنثی سویه *C5i4* هاله عدم رشد مشاهده شد. بر اساس نتایج به دست آمده، ترادف ناحیه ۱۶S rDNA چهار سویه *C4i2, C1d2, Y2c4, D3b1* که بالاترین درصد بازدارندگی باکتری‌های اندیکاتور (بالای۸۰ درصد) را نشان می‌دادند تکثیر و توالی‌یابی شد. بر این اساس چهار سویه به ترتیب لاکتوباسیلوس پنتوسوس، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم شناسایی شدند.

نتیجه گیری: باکتری‌های بومی جدا شده از فراورده‌های لبنی ایران بالقوه پروبیوتیک بوده و می‌توانند گزینه مناسبی به عنوان نگهدارنده طبیعی برای ممانعت از آلاینده‌های مواد غذایی باشند.

واژگان کلیدی: لاکتوباسیل، آنتاگونیسم، روش حفره‌ای، روش دولایه، ۱۶S rDNA

***نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکز، گروه زیست شناسی

Email: Ebrahimi_mt@yahoo.com

مقدمه

امروزه تولید محصولات پروبیوتیک وسعت جهانی یافته است و بیشتر مشتریان به افزایش سطح سلامت خود توسط این محصولات توجه خاصی دارند. یکی از مهم‌ترین این محصولات شیر و فرآورده‌های پروبیوتیک لبنی است. مصرف پروبیوتیک در اروپا و آسیا به خصوص ژاپن بسیار رایج است. امروزه صنایع غذایی و مراکز تحقیقاتی توجه بیشتری به شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک جدید با خصوصیات عملکردی مناسب و اثبات این عملکردها نشان می‌دهند چرا که اثبات این عملکردها در گسترش فروش این محصولات بسیار موثر است(۳-۱).

در تعریف امروزه پروبیوتیک‌ها را میکروارگانیسم‌های زنده‌ای می‌دانند که مصرف آن‌ها به تعداد معین ایجاد تاثیرات مفیدی در مصرف کننده می‌کند. از خصوصیات عملکردی این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی، کاهش کلسترول سرمی، کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش اسهال‌های مزمن و مسافرتی و کاهش احتمال ابتلا به سرطان اشاره کرد. بیشتر مطالعات در این زمینه روی لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریم‌ها صورت گرفته است. اگر چه باکتری‌های اسید لاکتیک روده‌ای دیگر مانند *انتروکوکوس* نیز ممکن است دارای خاصیت پروبیوتیکی باشند(۱، ۴).

باکتری‌های پروبیوتیک‌ها مواد مختلفی را تولید می‌کنند که هم برروی باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی اثر مهار کننده دارند. از این ترکیبات می‌توان به اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه مانند استات، لاکتات، پروپیونات، سوکسینات و بوتیرات، هم چنین پراکسید هیدروژن و ترکیبات پپتیدی شبه باکتریوسین اشاره کرد. این مواد نه تنها تعداد سلول‌های زنده پاتوژن‌ها را کم می‌کنند، بلکه ممکن است متابولیسم باکتری‌ها یا تولید سموم توسط آنها را نیز تحت تاثیر قرار دهند(۷-۵). از این ترکیبات می‌توان به صورت نگهدارنده در محصولات غذایی استفاده نمود. تولید این ترکیبات در باکتری‌های اسید لاکتیک از این نظر حائز اهمیت است که این باکتری‌ها میکروفلور غالب بسیاری از محصولات تخمیری هستند و در فرآوری و کنترل عوامل بیماری زای این محصولات نقش مهمی را ایفاء می‌کنند.از سوی دیگر مصرف محصولات حاوی این باکتری‌ها می‌تواند موجب تعدیل میکروفلور روده و مهار رشد میکروب‌های بیماریزا در سیستم گوارشی گردد(۸، ۹).

با توجه به روش عمل‌آوری محصولات لبنی در ایران انتظار می‌رود باکتری‌های پروبیوتیک در این محصولات وجود داشته باشد. از آنجا که این باکتری‌ها از منابع لبنی جدا شده‌اند، به کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی با مشکلات کمتری مواجه است. از این‌رو جداسازی، شناسایی و کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی می‌تواند راهکاری مناسب در جهت ارائه محصولات پروبیوتیک سنتی ایران و سویه‌های پروبیوتیک بومی با خصوصیات عملکردی ویژه باشد(۱۰).

لاکتوباسیل‌های مورد بررسی توانایی مقاومت در محیط اسیدی و املاح صفراوی در شرایط آزمایشگاهی(Invitro) را دارند، بنابراین احتمالا این سویه‌ها تحمل عبور و تکثیر در سیستم گوارشی را نیز دارند توانایی این سویه‌ها در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند دلیلی برای انتخاب این سویه‌ها به عنوان پروبیوتیک باشد. از سوی دیگر چون این سویه‌ها از محصولات لبنی جدا شده‌اند احتمال سازگاری و ماندگاری این سویه‌ها در محصولات لبنی بیشتر از باکتری‌های پروبیوتیک با منشاء غیر لبنی است(۱۱).

امروزه جهت شناسایی لاکتوباسیل‌ها از روش‌های پلی‌فازیک (بررسی‌های فنوتیپیک و ژنوتیپیک) استفاده می‌شود. تست‌های فنوتیپیک کلاسیک شناسایی لاکتوباسیل‌ها بر خصوصیات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مانند تخمیر جور و یا ناجور، تولید ایزومرهای اسید لاکتیک، متابولیسم سوبستراهای کربوهیدرات، کوآگولاسیون شیر، تولید برخی آنزیم‌ها و حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی استوار است اگرچه شناسایی لاکتوباسیل‌ها در

حد گونه بر اساس ویژگی‌های فنوتیپیک به علت تغییرات زیاد خصوصیات بیوشمیایی (الگوی تخمیر) مشکل است. در این جنس بسیاری از پروتئین‌های موثر در تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط پلاسمید کد می‌شود از اینرو ممکن است گوناگونی در نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی به علت نقل و انتقالات پلاسمیدی باشد(۲).

مقایسه سکانس‌های ژنrDNA روش مناسبی جهت مقایسه فیلوژنتیکی است. پیشرفت روش‌های ملکولی به ما این اجازه را داده است که بتوانیم ژن بلند rDNA را به طور کامل توالی شناسی کنیم. اگر چه سکانس‌های اختصاصی گونه معمولا در نیمه اول 16 S (V1-V3) rDNA قرار دارد ولی توالی شناسی کل قطعه ۱/۵ کیلوبایت می‌تواند دقت عمل را بالا ببرد(۱۲).

در تحقیقات قبلی ۲۲ سویه بالقوه پروبیوتیک از فراورده‌های لبنی سنتی ایران جدا گردید(۱۳). هدف این بررسی مطالعه توانایی آنتاگونیستی این سویه‌های لاکتوباسیل مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی و شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی سویه‌های منتخب است.

روش کار

در این مطالعه بنیادی- کاربردی۲۲ سویه مورد بررسی از محصولات لبنی تخمیری ناحیه لیقوان جداسازی شده و از نظر مقاومت به شرایط اسیدی و املاح صفراوی مقاوم گزارش داده شده‌اند(جدول ۱). این سویه‌ها بر اساس منبع جداسازی و مورفولوژی کلنی کد گذاری شده‌اند. از باکتری‌های اندیکاتور جهت بررسی توانایی آنتاگونیستی استفاده شد(جدول ۲). این باکتری‌ها از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی وعفونی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران وکلکسیون میکروبی آلمان (DSMZ) تهیه شدند.

جدول۱. منبع سویه‌های لاکتوباسیل

کد سویه	منبع جداسازی
C6m3	پنیر لیقوان- تازه
Y1m4	ماست لیقوان
C6m1	پنیر لیقوان- تازه
Y2l6	ماست حلبی
Y3f3	ماست حلبی
y2c4	ماست حلبی
C1d2	پنیر لیقوان- دو ماهه
C5a10	پنیر سبلان-سه ماهه
Y1l4	ماست
C6l2	پنیر لیقوان- تازه
Y2p3	ماست حلبی
Y2b10	ماست حلبی
D3b1	دوغ لیقوان
K1l4	کشک
C2h1	پنیر لیقوان- تازه
K2l3	کشک
C4i2	پنیر لیقوان- سه ماهه
D2d1	دوغ
C5b4	پنیر سبلان- سه ماهه
C5b5	پنیر سبلان- سه ماهه
C6c4	پنیر لیقوان- تازه

جدول۲. باکتری‌های اندیکاتور مورد استفاده در آزمون‌های اثرات ضدمیکروبی

نام باکتری	ردیف
Escherichia coli	ATCC 2143
staphylococcus aureus	ATCC 64542
listeria monocytogenes	ATCC 345
Yersinia.entrocolitica	ATCC 25673
Listeria innocua	DSMZ 20649

جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی از روش دولایه (Bilayer) و روش حفره ا(Weell- diffusion) استفاده گردید. در روش دو لایه ابتدا باکتری‌های اشرشیا کلی(E. coli) و استافیلوکوکوس اورئوس(S. aureus) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و باکتری‌های یرسینیا انتروکولیتیک(L.entrocolitica)، لیستریا اینوکوا (L. innocua) و لیستریا مونوسایتوژنز (L.monocytogenes)

در محیط BHI broth (Brain Heartbroth Infusion) به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. سپس سویه‌های لاکتوباسیل مورد آزمایش در وسط پلیت MRS agar (de Man, Rogosa and Sharpe) به صورت نقطه‌ای کشت داده شدند. قبلا محدوده کشت به صورت دایره‌ای به قطر ۱ سانتی‌متر تعیین شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ درصد دی اکسید کربن گرمخانه گذاری شدند. کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت توسط پنبه استریل پاک شدو به منظور کشته شدن سلول‌های باقی‌مانده در سطح پلیت‌ها، ۱۵ دقیقه تحت تاثیر بخار کلروفورم قرار داده شدند(۷، ۱۴). از باکتری‌های اندیکاتور که در فاز لگاریتمی رشد قرار داشتند به میزان ۰/۵ درصد به محیط‌های BHI agar (۰/۷ درصد آگار) استریل تلقیح شد(۷). ۵ میلی لیتر از محیط‌های کشت حاوی اندیکاتور روی هر محیط MRS agar پخش گردید. پس از بسته شدن، به منظور تسریع نفوذ مواد تولید شده توسط لاکتوباسیل در محیط BHI agar محیط ها به مدت ۲ ساعت در یخچال نگهداری شدند. در نهایت پلیت‌ها ۲۴ ساعت براساس دمای مناسب رشد باکتری‌های اندیکاتورشان در دماهای ۲۸ درجه سانتی‌گراد یا ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. توانایی فعالیت ضد میکروبی و در صد بازدارندگی سویه‌های مورد بررسی براساس قطر هاله عدم رشد باکتری‌های اندیکاتور برحسب میلی متر بین ۱۰۰ تا صفر درصد تعیین شد. محیط‌های کشت باکتریایی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند.

در روش حفره‌ای برای تهیه عصاره (supernatant) لاکتوباسیل‌ها کشت لاکتوباسیل‌های مورد بررسی (جدول۱) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ درصد دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند. سپس این کشت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی از توده باکتریایی جدا شد. قسمتی از مایع رویی بدون تغییر pH (عصاره اسیدی) حفظ و pH باقی مایع رویی با سود ۴ مولار در حد ۷ تنظیم گردید(عصاره خنثی)(۲).

جهت تهیه محیط کشت اندیکاتور به ۶ ارلن محیط کشت Soft BHI agar (۰/۷ درصد آگار) در دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد ۰/۵ درصد از باکتری‌های اندیکاتور یک شب کشت شده تلقیح شد (به هر ارلن یک گونه باکتری اندیکاتور)و سریعاً این محیط‌ها در پلیت‌های ۷ سانتی‌متری پخش گردید. سپس روی محیط حفره‌هایی به قطر ۵ میلی لیتر ایجاد شد(۱۵).

برای تلقیح عصاره خنثی لاکتوباسیل‌ها داخل هر حفره ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره خنثی لاکتوباسیل‌های مورد بررسی ریخته شد. به منظور نفوذ عصاره‌ها در آگار تمام پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های اشرشیا کلی ، استافیلوکوکوس اورئوس و دمای۲۸ درجه سانتی‌گراد برای گونه‌های لیستریا مونوسایتوژنز، یرسینیا انتروکولیتیکا، لیستریا اینوکوا گرمخانه گذاری شدند. پس از این مدت قطر هاله عدم رشد اطراف حفره‌ها براساس میلی‌متر اندازه‌گیری و براساس اندازه قطر هاله‌ها، فعالیت ضد میکروبی سویه های لاکتوباسیل تعیین گردید(۱۶، ۱۷).

شناسایی سویه‌های برتر باکتریایی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی انجام شد. در روش بیوشیمیایی سویه‌های دارای فعالیت ضد میکروبی مناسب انتخاب شده از مرحله قبل، براساس صفات شکلی و بیوشیمیایی مانند توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، تولید اسید و گاز از گلوکز، تخمیر قندهای مختلف و تولید NH_3 از آرژنین براساس کتاب برگی شناسایی شدند. کلیه آزمایشات بر روی باکتری‌ها در مرحله رشد لگاریتمی صورت گرفته است(۲۰-۱۸). به منظور شناسایی قطعی سویه باکتریایی از روش شناسایی ژنتیکی S ۱۶rDNA استفاده شد.

استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعت سویه‌های منتخب طبق پروتکل ولینگتون (۲۰۰۳) انجام شد. برای

تخریب ساختار دیواره از محلول ۰/۸ درصد کلرید سدیم (NaCl)، لیزوزیم و شوک حرارتی۷۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. جهت رسوب پروتئین‌ها از محلول فنل کلروفورم استفاده شد. به منظور بررسی کمی و کیفی استخراج DNA از ژل الکترفورز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفوتومتر استفاده شد. در نهایت DNA با غلظت ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق سازی شدند(۲۱، ۲۲).

جهت تکثیر ناحیه 16S rDNA از آغازگرهای 630R و 616V استفاده شد. در این پرایمرها Y نشان‌دهنده بازهای سیتوزین، تیمین، M آدنین، سیتوزین و K گوانین، تیمین می‌باشند.

616V, 59-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-39;
630R, 59-CAKAAAGGAGGTGATCC-39.

جهت انجام واکنش (Polymerase Chain Reaction) PCR از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) استفاده شد. تمام ترکیبات از شرکت فرمنتاز (Fermentase) تهیه شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۲۰ نانوگرم DNA به عنوان الگو، ۱۰ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای رفت و معکوس، با غلظت نهایی۱/۸۹ میکرومولار کلرید منیزیوم، ۲/۵ میکرومولار از هر یک از GTP,dCTP,dTTP,dATP به همراه 1X بافر PCR و یک واحد از آنزیم Tag DNA Polymerase و با شرایط دمایی ۱ سیکل به مدت ۲ دقیقه در دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت بازی اولیه و ۳۰ سیکل با برنامه دمایی ۴۵ ثانیه در۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۲ درجه سانتی‌گراد و۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۱ سیکل با برنامه دمایی ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و ۴ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد(۲۳).

محصولات PCR در روی ژل آگارز ۱ درصد تفکیک شدند و باندهای مورد نظر بریده شده و به تیوپ‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شدند.

استحصال(Recovery) مجدد DNA از ژل با استفاده از کیت استخراج DNA از ژل انجام شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده توسط شرکت MWG انجام گردید. ترادف قطعات تعیین توالی شده در بانک اطلاعاتی (Basic Local Alignment Search Tool) BLAST مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

در روش دو لایه براساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در مرکز پلیت، لاکتوباسیل‌ها از نظر توانایی کاهش رشد باکتری‌های اندیکاتور اشرشیا کلی، استافیلوکوس اورئوس، لیستریا مونوسایتوژنز، یرسینیا انتروکولیتیکا، لیستریا اینوکوا تقسیم‌بندی شدند. نتایج این آزمون و درصد بازدارندگی هر یک از سویه‌ها در جدول ۳ درج شده است.

براساس درصد بازدارندگی لاکتوباسیل‌های مورد مطالعه در سه گروه بازدارنده (درصد بازدارندگی بالای ۷۵ درصد)، نیمه بازدارنده (درصد بازدارندگی بین ۷۵ -۴۰ درصد) و غیر بازدارنده (درصد بازدارندگی کمتر از ۴۰ درصد) گروه‌بندی شدند. *سویه‌های C4i2, C1d2, Y2c4, D3b1* در گروه بازدارنده، سویه‌های *K1l4,C5i4, ,Y2l6, C2h1, K2l3, Y1m4, Y1l4, Y2p3, C6l2* در گروه نیمه بازدارنده و باقی سویه‌ها در گروه غیر بازدارنده قرار گرفتند.

در روش حفره‌ای پس از تلقیح عصاره‌های خنثی و اسیدی به چاهک‌های محیط های کشت اندیکاتور و ۲٤ ساعت گرم‌خانه گذاری در شرایط اپتیمم نتایج براساس قطر هاله ایجاد شده در اطراف چاهک برحسب میلی متر گزارش شد. اطراف چاهک‌های حاوی عصاره اسیدی سویه‌های *C5i4,Y1l4,K2l3,C4i2,C6l2* هاله عدم رشد مشاهده گردید.در حالی که تنها در اطراف چاهک حاوی عصاره خنثی سویه *C5i4* در محیط حاوی لیستریا مونوسایتوژنز، هاله دیده شد. نتایج این آزمون در جدول ٤ آمده است.

جدول۳. اندازه‌گیری هاله عدم رشد باکتری‌های اندیکاتور در روش دولایه (برحسب میلی متر) و تعیین درصد بازدارندگی سویه‌های لاکتوباسیل

کد سویه	E.coli,	S.aureus ,	L.monocytogenes	L.inocua	Y.enterocolitica	درصد بازدارندگی
C4i2	۴/۷	۵/۴	۵	۵/۵	۶	۸۸/۷
C6m3	۰/۵	۲/۲	۲			۱۵/۷
C1d2	۵	۴	۴	۴	۶	۷۶/۷
C2h1	۲	۲/۲	۴	۲		۴۳/۰
K2l3	۳	۲	۴	۶		۵۰/۰
K1l4	۳	۶	۶	۲/۲	۶	۶۰
Y1m4	۲	۳	۲	۶		۴۳/۳
Y1l4	-	۳	۴	۴	۲	۴۳/۳
Y2n2	۱	۶	۱/۲			۲۷/۳
Y2f3	۳		۲/۶	۴	۱	۳۵/۳
Y2b9	۳	۳		۲		۲۶/۷
Y2b10	۲	۶			۲	۳۳/۳
Y2c4	۵	۲	۶	۶	۶	۸۳/۳
C5i4	۱/۱	۶	۶	۲/۵	۶	۷۲/۰
C6m1	۳	۰/۶	۲/۲			۱۹/۳
Y2p3		۱	۵	۶	۶	۶۰/۰
Y2l6	۴	۶	۶	۳	۲	۷۰/۰
D3b1	۶	۳	۶	۶	۲	۷۶/۷
C6l2	۴	۴	۶		۶	۶۶/۷

جدول٤. قطر هاله اطراف چاهک حاوی عصاره اسیدی برحسب میلی متر

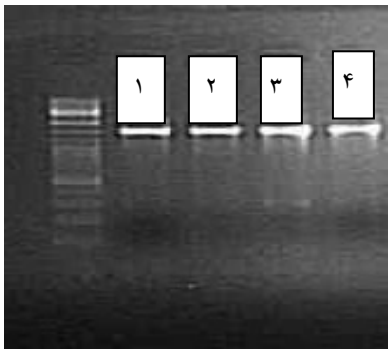
کد سویه	Y.enterocolitica	L.inocua	L.monocytogen	S.aureus	E.coli,
C4i2	–	۲	۳	۳	۵
K2l3	–	–	۱	–	۱
Y1l4	–	–	۳	۳	–
C5i4	۲	۱	۳	۲	۲
C6l2	–	–	۲	۳	–

جهت شناسایی سویه‌های برتر باکتریایی براساس آزمون‌های بیوشیمیایی کتاب برگی *سویه‌های C4i2, C1d2, Y2c4, D3b1* گروه بازدارنده و *سویه‌های C6l2، C5i4، Y2l6، C2h1، K2l3 Y1m4، Y1l4، Y2p3* و *K1l4* گروه نیمه بازدارنده شناسایی شدند که نتایج آن در جدول ۵ قید شده است. *سویه‌های C4i2, C1d2, Y2c4, D3b1* که بالاترین توانایی بازدارندگی باکتری‌های اندیکاتور را داشتند توسط آزمون ژنتیکی (بررسی توالی ناحیه ۱۶S rDNA) شناسایی شدند.

جدول۵. شناسایی بیوشیمیایی سویه‌های دارای فعالیت ضدمیکروبی

کد ایزوله	نتیجه شناسایی بیوشیمیایی
C4i2	L. farieminis
D3b1	L. planetarium
C1d2	L.lactis
K1l4	L. planetarium
Y1m4	L. casei
K2l3	L. agilis
Y1l4	L. alimentarium
C6l2	L. rhumnosus
C2h1	L. lactis
y2c4	L. casei
Y2l6	L. casei
Y1m4	L. casei
Y2p3	L. casei

براساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همان طور که در شکل ۱ مشهود است باندها در ناحیه ۱۷۰۰ بازی تشکیل شده‌اند. ایجاد باندهای متعدد احتمال خطا در مراحل توالی یابی را افزایش می‌دهد، ازاین‌رو سعی شد با برش محصول PCR احتمال ایجاد باندهای اضافی کاهش داده شود.



شکل۱. محصول DNA PCR ایزوله‌ها (1) C4i2, C1d2(2), Y2c4(3), D3b1(4) بر روی ژل آگارز ۱درصد M، Ladder 1kb می‌باشد.

ترادف ناحیه ۱۶S rDNA ایزوله‌های C4i2, C1d2, Y2c4, D3b1 با سایر باکتری‌ها در بانک اطلاعاتی BLAST مقایسه گردید.نتایج نشان داد ایزوله D3b1 ۱۰۰ درصد با لاکتوباسیلوس پنتوسوس (Lactobacillus pentosus) سویه NRIC 1837 ایزوله Y2c4 ۹۹ درصد با لاکتوباسیلوس برویس (Lactobacillus brevis) سویه TCCC13001 ایزوله C1d2 ۹۸ درصد لاکتوباسیلوس پنتوسوس سویه WH12-2-1 و ایزوله C4i2 ۹۸ درصد با لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم (Paraplantarum Lactobacillus) سویه KNUC25 همولوژی دارد.

بحث

باکتری پروبیوتیک برای رسیدن به روده و ایجاد شرایط مناسب، ابتدا باید از محیط شدیدا اسیدی معده و املاح صفراوی روده عبور کند. ازاین‌رو اولین قدم در گزینش لاکتوباسیلهای پروبیوتیک انتخاب سویه‌های متحمل اسید و صفرا است. در این مطالعه از ایزوله‌های مقاوم به شرایط اسیدی و املاح صفراوی جدا شده از محصولات لبنی تخمیری استفاده شد.از این‌رو می‌توان پیش‌بینی کرد مصرف سویه‌هایی که فعالیت ضدباکتریایی مناسبی دارند احتمالا موجب کاهش بیماری‌های گوارشی در مصرف کننده می‌شوند. از آنجا که این سویه‌ها از محصولات لبنی جدا شده‌اند، می‌توان به بی‌خطر بودن و هچنین ماندگاری مناسب این باکتری‌ها در محصولات لبنی اطمینان داشت.

در روش دولایه تمامی سویه‌ها تا حدودی توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماریزا را نشان دادند و درصد بازدارندگی رشد این سویه‌ها بین ۲۰ -۱۰۰ درصد متغییر بود. از سوی دیگر این باکتری‌ها جلوی رشد باکتری‌های گرم مثبت را بهتر از باکتری‌های گرم منفی می‌گیرند. این نتایج نشان می‌دهد مواد شبه باکتریوسین تولیدی لاکتوباسیل‌های مورد بررسی طیف اثر وسیعی داشتند و برخلاف باکتریوسین‌های تولیدی از باکتری‌های گرم منفی روی هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر می‌گذارند. این نتیجه با نتایجی که کالچایاناند و اشلینگر در سال‌های ۱۹۸۹و۱۹۹۲ گزارش کرده‌اند مطابقت دارد(۲۴، ۲۵).

در روش حفره‌ای عصاره اسیدی تعداد معدودی از سویه‌ها موجب مهار رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زا شدند. از سوی دیگر در این روش با استفاده از عصاره خنثی تنها یک سویه توانایی مهار رشد لیستریا مونوسایتوژنز را داشت. از آنجا که در روش حفره‌ای عصاره بسیاری از سویه‌ها حتی بدون تنظیم pH ایجاد هاله عدم رشد روی محیط آگار ننمود، عدم توانایی مهار رشد باکتری‌های اندیکاتور در روش حفره‌ای را می‌توان به وابستگی ترکیبات شبه باکتریوسین به غشاء باکتری اسید لاکتیک نسبت داد. توره و همکاران در سال ۲۰۰۳ عدم تطابق نتایج بررسی تولید ترکیبات ضد میکروبی با دو روش دو لایه و حفره‌ای را به مقدار جزئی عصاره نسبت دادند. از سوی دیگر حدس زده می‌شود تماس مستقیم دو سلول اندیکاتور و سلول تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی موجب تحریک سنتز و ترشح

ترکیبات ضد میکروبی می‌شود. هم‌چنین در گزارشات دیگر طیف اثر ضد میکروبی لاکتوباسیل‌ها وابسته به pH اعلام شده است. بسیاری از باکتریوسین‌ها به دلیل ساختار کاتیونیک فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری در pH های اسیدی کمتر از ۵ نشان می‌دهند از سوی دیگر ترکیبات شبه باکتریوسین تولیدی توسط باکتریهای اسید لاکتیک پروتئینی می‌باشند و تغییرات pH می‌تواند روی ساختار و طیف ضدمیکروبی این ترکیبات اثرگذار باشد(۱۷، ۲۶).

در مطالعه برومبرگ و همکاران در سال ۲۰۰۴ ،۶۱ درصد از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از فرآورده‌های تخمیری گوشتی فعالیت ضد میکروبی در آزمون ساندویچی (روشی مشابه روش دو لایه) نشان دادند و از این تعداد تنها ۳۱ درصد در روش حفره‌ای توانایی ممانعت از رشد باکتری‌های اندیکاتور را روی محیط آگار داشتند. در بررسی مشابهی لوک و اشلینگر سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس ساکی(L. sake) را از نظر توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا با دو روش دولایه و حفره‌ای مورد بررسی قرار دادند. از سویه‌های که توانایی مهار رشد باکتری‌های اندیکاتور را در روش دولایه داشتند هیچ کدام در روش حفرهای ایجاد هاله عدم رشد ننمودند. پس از افزایش غلظت مایع‌رویی (vac-speed) ۶ سویه از ۱۹ سویه مورد بررسی روی محیط آگار ایجاد هاله عدم رشد نمودند(۵، ۲۷).

مقایسه نتایج به دست آمده در این بررسی با نتایج گزارش شده نشان می‌دهد باکتری‌های اسید لاکتیک دارای طیف ضد میکروبی وسیع‌تری نسبت به باکتری‌های گرم منفی می‌باشند و در غربال باکتری‌های اسید لاکتیک دارای فعالیت ضد میکروبی باید از طیف وسیعی از باکتری‌های اندیکاتور استفاده نمود. از سوی دیگر روش دو لایه روشی مناسب برای بررسی توانایی مهار باکتری‌های اندیکاتور توسط باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط محیطی است چراکه این باکتری‌ها در تماس مستقیم (مشابه شرایط محیطی مثلا روده انسان یا محیط غذایی غیر استریل)توانسته‌اند جلوی رشد باکتری‌های اندیکاتور را بگیرند. هم‌چنین روش حفره‌ای به دلیل مقدار جزئی عصاره مورد بررسی، تغییر pH عصاره و عدم تماس مستقیم سلول اندیکاتور و سویه مورد آزمون می‌تواند موجب حذف سویه دارای پتانسیل ضد میکروبی شود.

لاکتوباسیل‌ها در زیر میکروسکوپ غیر متحرک، بدون اسپور، گرم مثبت و میله‌ای بلند تا کورینه‌فورم می‌باشند. البته بسیاری از جنس‌ها چنین خصوصیات فنوتیپی را نشان می‌دهند. در این جا می‌توان با تست های ساده‌ای مثل تحمل اکسیژن، کاتالاز منفی و توانایی رشد روی محیط کشت اسیدی MRS جنس لاکتوباسیل را شناسایی کرد.

تست‌های فنوتیپیک کلاسیک شناسایی گونه های جنس لاکتوباسیل بر خصوصیات بیوشیمیایی مانند تخمیر جور و یا نا جور، تولید ایزومرهای اسید لاکتیک متابولیسم سوبستراهای کربوهیدرات، کوآگولاسیون شیر، تولید برخی آنزیم‌ها و حساسیت‌های آنتی‌بیوتیکی استوار است. لاکتوباسیل‌ها عموماً شیمیوارگانوتروف هستند و کربوهیدرات‌ها را تخمیر و تولید اسید لاکتیک می‌کنند. اگر چه شناسایی لاکتوباسیل‌ها در حد گونه به علت تغییرات زیاد خصوصیات بیوشمیایی (الگوی تخمیر) مشکل می‌باشد. به همین علت است که شاهد دسته بندی‌های گروهی می‌باشیم، به طور مثال گروه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (L. plantarum) که شامل زیر گونه‌های لاکتوباسیلوس پنتوزوس، لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم و لاکتوباسیلوس پلانتاروم است(۳، ۲۸).

نواحی ۲۳S rDNA و ۱۶S rDNAنواحی حفظ شده و بسیار کم تغییری در گونه‌های مختلف پروکاریوتی نسبت به نواحی دیگر کروموزومی می‌باشند و خاص هر گونه هستند. پرایمرهای 616V و 630R به طور گسترده‌ای در بررسی و آنالیز ناحیه ۱۶ S rDNA باکتری‌های اسید لاکتیک در محصولات لبنی استفاده می‌شود. تکثیر، توالی یابی و مقایسه این ناحیه روشی مورد قبول برای شناسایی

باکتری‌ها و یا بررسی تغییرات جمعیتی در طی پروسه تخمیر است(۲۳، ۲۹).

عدم تطابق نتایج به دست آمده از شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی در این آزمون نشان می‌دهد که آزمون‌های بیوشیمیایی روش مناسبی برای شناسایی لاکتوباسیل‌ها نمی‌باشد و شناسایی گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها براساس توالی ناحیه۱۶ S rDNA روش مناسبی است. این نتایج با مشاهدات آنوک و همکاران در سال ۲۰۰۴ و پناچیا و همکاران در سال ۲۰۰۳ تطابق داشت(۳۰، ۳۱).

نتیجه‌گیری

۱- روش دولایه روشی مناسب برای غربال باکتری‌های اسید لاکتیک دارای توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماریزا و روش چاهک روشی مناسب برای بررسی تولید ترکیبات باکتریوسینی خارج سلولی است.

۲- لاکتوباسیل‌ها توانایی مهار رشد گونه‌های متعدد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را دارند.

۳- شناسایی بیوشیمیایی روش مناسبی برای شناسایی لاکتوباسیل‌ها نیست.

۴- بررسی‌ها تکمیلی داخل و خارج آزمایشگاهی (invitro-invivo) روی این سویه‌ها مثل توانایی اتصال به سلول‌های محیط کشت سلولی Caco2 و اپیتلیال روده موش آزمایشگاهی می‌تواند منجر به ارائه سویه‌های پروبیوتیک مناسب برای تولید در حد تجاری گردد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاران بخش ریزسازواره و ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج که با فراهم آوردن امکانات لازم انجام این تحقیق را میسر نمودند تشکر می‌شود.

منابع

1. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek 2002;82:279-89.
2. Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Le Lait 2003; 83:269-306.
3. Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int J of Food MicrobioLogy 1998; 41: 103-25.
4. Ambadoyiannis G, Hatzikamari M, Litopoulou- Tzanetaki E, Tzanetakis N. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. Food Biotechnology 2004; 18: 307-25.
5. Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology 1989;55:1901-6.
6. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1976; 40:722-56.
7. Upreti GC, Hinsdill RD. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative lactobacillus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1973;4:487-94.
8. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Purification and characterization of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B.Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1984; 26:328-34.
9. Björkroth J, Korkeala H. Slime-producing Lactobacillus sake strains possess a strong competitive ability against a commercial biopreservative. Int J of Food Microbiology 1997;38:117-23.
10. Saavedra L, Taranto MP, Sesma F, de Valdez GF. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic enterococcus faecium strains. Int J of Food Microbiology 2003; 88: 241-45.
11. Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S. Quality assurance...

criteria for probiotic bacteria. American J of Clinical Nutrition 2001; 73:393S
12. Woese CR. Bacterial evolution. Microbiology and Molecular Biology Reviews 1987; 51:221-71.
13. Tajabady Ebrahimi M, Hejazi MM, Nohi A [Study on probiotc properties of Lactobacillus isolated from traditional dairy products of Lighvan]. J of Science Tarbiat Moallem University 1386; 7 (3-4): 941-52.
14. Liong MT, Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. J of Dairy Science 2005; 88: 55-66.
15. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews 2004; 28: 405-40
16. Robredo B, Torres C. Production by Lactobacillus salivarius of animal origin. J Chin Microbiol 2000; 38: 3908-9.
17. Toure R, Kheadr E, Lacroix C, Moroni O, Fliss I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against Listeria monocytogenes. J of Applied Microbiology 2003;95:1058-69.
18. Nair PS, Surendran PK. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. J of Culture Collections 2005; 4:48-52.
19. Fagnant JE, Sanders CC, Sanders WE. Development and evaluation of a biochemical scheme for identification of endocervical lactobacilli. J of Clinical Microbiology 1982; 16: 926-34.
20. Sneath PHA, Holt JG, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore: Williams& Wilkins 1989.p.1209-34.
21. Muyanja C, Narvhus JA, Treimo J, Langsrud T. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a ugandan traditional fermented beverage. Int J of Food Microbiology 2003; 80: 201-10.
22. Araújo WL, Angellis DA, Azevedo JL. Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. Brazilian Archives of Biology and Technology 2004; 47: 375-80.
23. Ehrmann MA, Muller MRA, Vogel RF. Molecular analysis of Sourdough reveals Lactobacillus mindensis sp. nov. Soc General Microbiol 2003; 53(1): 7-13.
24. Kalchayanand N, Hanlin MB, Ray B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. Letters in Applied Microbiology 1992; 15: 239-43.
25. Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology 1989; 55:1901 -6.
26. Zajdel JK, Ceglowski P, Dobrazanski WT. Mechanism of action of lactostrepcin 5, a bacteriocin produced by Streptococcus cremoris 202. Applied and Environmental Microbiology 1985; 49: 969-74.
27. Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR, Oliveira J. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Brazilian J of Microbiology 2004; 35: 137-44.
28. Coeuret V, Gueguen M, Vernoux JP. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. J of Dairy Research 2004; 71: 451-60.
29. Einspanier R, Lutz B, Rief S, Berezina O, Zverlov V, Schwarz W, et al. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. European Food Research and Technology 2004; 218: 269-73.
30. Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. J of Applied Microbiology 2003; 94:403-12.
31. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science 2004; 67: 309-17.

Journal of Arak University of Medical Sciences
Summer 2009; 12(2): 17-27

Original Article

Antagonistic ability of acid and bile tolerance *Lactobacillus* were isolated from dairy products

Tajabadi Ebrahimi M*[1], Hejazi MA[2], Ghafary R[3], Jafari P[4]

1- Assistant Professor, Faculty Member of Azad Islamic University of Iran, Tehran Central Branch, Tehran, Iran
2- Research Assistant Professor, Faculty Member of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Tabriz, Iran
3- MSc of Agriculture, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Tehran, Iran
4- Assistant Professor, Faculty Member of Azad Islamic university of Iran, Arak Branch, Arak, Iran

Received 4 Nov, 2008 Accepted 8 Jul, 2009

Abstract

Background: In order to selected indigenous potential probiotic bacteria, we surveyed antagonistic activities of 22 strains of acid and bile tolerant *Lactobacillus*, isolated from traditional dairy products by biochemical and molecular methods.

Methods and Materials: In a fundamental practical study assessment of antimicrobial activity of this strain with neutrallized and Dual layer two methods against bacterial pathogene such as *E-coli, L.monocytogenes, S.auteus* and *Y.entercolitica* was done. These strain were identified with two methods for determining of biochemical and sequence of 16Sr DNA.

Results: Dual layer method based on the growth of zone diameter were estabilished in three groups of strains; inhibitors, semi inhibitors and non inhibitors. Neutralize method around well acidic extract containing strains C5i4, Y144, K213, C4i2, C612 and neutral extract C5i4 zone blight strains was observed. Based on the results, sequence area 16Sr DNA of four strains includle C4i2, C1d2, Y2c4, D3b1 indicator bacteria that revealed the highest percentage of inhibitor effect of bacterial indicators, were duplicate and sequency. So four strains *L.Bacilus Pentosus, L.Bacillus Bervis* and *L. Bacillus Paraplantarum*, were indentifed respectivey.

Conclusion: It seems that indigenous lactobacillus from Iranian dairy products have potential as probiotics. So use of them as bio preservative prevent food bacterial contamination.

Key words: Lactobacillus, Antagonistic Activity, Well-Diffusion, Bilayers, 16S rD

*Corresponding author;
Email: Ebahimi_mt@yahoo.com
Address: Department of biology, Tehran central branch, Azad Islamic University, Tehran, Iran