

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک از شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی

طاهره نریمانی^۱ و علیرضا تارینژاد^{۲*}

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۶

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

^۲ دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

* مسئول مکاتبه: Email: atarinejad@yahoo.com

چکیده

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از فلور موجود در شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی می‌باشد. برای رسیدن به این هدف، باکتری‌های اسید لاکتیک توسط روش‌های فنوتیپی (مورفولوژی سلولی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست‌های بیوشیمیایی شامل رشد در دماها و غلظت‌های مختلف نمک و نیز تخمیر انواع قندها) جداسازی شدند و پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها (مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفرآوری) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای شناسایی دقیق‌تر با جفت آغازگرهای اختصاصی، ژن 16S rRNA باکتری‌ها تکثیر و بعد از خالص‌سازی محصول PCR، ژن مورد نظر برای توالی‌یابی ارسال شد. در پایان تحقیق، ۱۳ سویه لاکتوباسیلوس و ۶ سویه انتروکوکوس به عنوان فلور میکروبی طبیعی دارای پتانسیل پروبیوتیکی در شهرستان خوی گزارش شدند که کیفیت فراورده‌های لبنی این مناطق را تأمین می‌نمایند و این سویه‌ها پتانسیل کاربرد در فراورده‌های لبنی تولید شده در صنعت را دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: انتروکوکوس، باکتری‌های پروبیوتیک، ژن 16S rRNA، لاکتوباسیلوس

مقدمه

نشان داد که باکتری موجود در لبنیات بلغاری‌ها، علت افزایش طول عمر مردم این ناحیه بوده است که به عنوان لاکتوباسیلوس بولگاریکوس شناخته شد (مکنیکف ۱۹۰۷). باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان مکمل‌های غذایی زنده میکروبی و با اصلاح تعادل میکروبی روده، میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. پروبیوتیک‌ها به‌طور فزاینده-ای به عنوان مکمل‌های رژیمی به صورت قرص، کپسول،

از گذشته‌های بسیار دور، مردم دنیا می‌دانستند که مصرف شیر و محصولات لبنی تأثیر زیادی بر سلامتی آن‌ها دارد و حتی در طب سنتی از برخی از فراورده‌های تخمیری شیر استفاده می‌نمودند. اما در آن زمان وجود میکروارگانیسم‌ها در فراورده‌های لبنی اثبات نشده بود تا زمانی که دانشمند روسی مکنیکف، برای اولین بار

مطالعه روابط فیلوژنتیکی بین میکروارگانیسم‌ها و شناسایی صحیح‌تر آن‌ها ممکن است (هولزافل و همکاران ۱۹۹۸؛ چارتریس و همکاران ۱۹۹۷). با توجه به روند رو به رشد مصرف فراورده‌های لبنی پروبیوتیک در جهان و کشورمان و افزایش استفاده از فراورده‌های لبنی به عنوان ابزاری برای انتقال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به دستگاه گوارش، بررسی پتانسیل پروبیوتیکی فراورده‌های لبنی سنتی شیر و ماست محلی گاومیش شهرستان خوی به عنوان یک نمونه مورد مطالعه و جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی به منظور امکان استفاده از آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی منطقه به عنوان فراورده‌های پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های شیر و ماست سنتی گاومیش از شهرستان خوی جمع‌آوری و در فالكون‌های استریل و در درون بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت اولیه

تهیه سوسپانسیون باکتریایی از نمونه‌های شیر و ماست با استفاده از محلول پپتون فیزیولوژیکی (PPS) استریل (۸/۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم و ۱ گرم بر لیتر پپتون باکتریولوژیکی) انجام شد. ابتدا حدود ۱۰ گرم از نمونه‌های ماست با استفاده از یک قاشقک استریل و ۱۰ میلی-لیتر از نمونه‌های شیر برداشته شد و هر کدام به صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر PPS استریل انتقال گردید و به آرامی تکان داده شد تا میکروارگانیسم‌ها جدا شوند. بعد از نیم ساعت ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده به صورت جداگانه، به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS مایع انتقال یافت و در شرایط کم‌هوایی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پائین) و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید تا باکتری‌ها به حداکثر

خمیر و تیمارهای منجمد خشک شده به بازار عرضه می‌شوند (سالمین و همکاران ۱۹۹۸). اخیراً آزمون‌های بالینی اثرات مفید باکتری‌های پروبیوتیک از قبیل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تحریک سیستم ایمنی، تعدیل هموستازی ایمنی سیستمیک، خصوصیات ضد توموری و اصلاح عدم تحمل لاکتوز را نشان داده‌اند. همچنین محققان به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های پروبیوتیک با تولید باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی، رشد پاتوژن‌ها را مهار می‌کنند (سالمین و همکاران ۱۹۹۸).

از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده‌اند که در این میان دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزو فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیر شده بوده و کاندیدای خوبی برای پروبیوتیک محسوب می‌شوند (کلین هامر و همکاران ۲۰۰۰).

لاکتوباسیلوس‌ها میله‌ای شکل و گرم مثبت بوده و در صنعت غذا از جمله در سرکه‌سازی، تولید پنیر و ماست نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند (براین و همکاران ۱۹۹۹). جنس انتروکوکوسی یکی دیگر از جنس‌های اصلی باکتری‌های اسیدلاکتیک را تشکیل می‌دهد و توزیع وسیع آن‌ها در طبیعت احتمالاً بوسیله ماندگاری و مقاومت به فاکتورهای بازدارنده رشد توضیح داده می‌شود (هولزافل و همکاران ۲۰۰۲).

تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک‌های صفاوی از جمله خصوصیات اولیه و ضروری تحقیق برای غربالگری سویه‌های با پتانسیل پروبیوتیکی در نظر گرفته شده است (دورمه و همکاران ۲۰۰۱).

علاوه بر شناسایی بیوشیمیایی، استفاده از ژن 16S rRNA در شناسایی مولکولی توسط واکنش PCR انجام شده است (بولوت ۲۰۰۲؛ ساکیر ۲۰۰۳). ژن 16S rRNA دارای طول تقریباً ۱۵۴۰ باز است و مناطق متغیری دارد، ساختار کلی حفاظت شده است. از ویژگی سراسری گرفته تا ویژگی گونه استفاده از ژن 16S rRNA برای

انکوبه گردیدند. برای تعیین درصد بقا، CFU در لحظه تلقیح و در انتهای انکوباسیون ۳ ساعته در محیط معدنی PBS، برای هر سویه به صورت جداگانه تعیین گردید. برای تعیین CFU به ازای هر میلی‌لیتر، در زمان صفر (لحظه تلقیح) و در انتهای ساعت ۳، از کشت‌های باکتریایی اولیه و تلقیح شده در محیط PBS به صورت سریالی تا ۱۰ برابر رقت‌سازی با سرم فیزیولوژی و برای هر رقت دو کشت به صورت پورپلیت انجام گردید و پلیت‌ها به صورت کم هوازی و در دمای 37°C به مدت ۲-۳ روز انکوبه شدند. در پایان مدت انکوباسیون، پلیت‌ها از انکوباتور برداشته شدند و برای حضور کلنی‌های قابل مشاهده بررسی شدند. پلیت‌های دارای تعداد قابل شمارش از کلنی‌ها و به‌طور معمول پلیت‌های دارای ۳۰ الی ۳۰۰ کلنی، برای شمارش انتخاب شدند و تعداد کلنی‌های هر پلیت یادداشت گردید. تعداد کلنی‌های تقریباً یکسان در پلیت‌های تکراری در هر سطح رقت و همچنین اختلاف تقریباً ۱۰ برابری کلنی‌ها در رقت‌های متوالی صحت شمارش را نشان داد و در نهایت CFU برای هر کشت باکتریایی محاسبه گردید.

تعیین مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی

محیط کشت MRS مایع به عنوان کنترل و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد املاح صفراوی به عنوان کشت مورد آزمایش (تیمار) به‌طور همزمان با یک درصد از کشت باکتریایی فعال ۲۴ ساعته تلقیح و در دمای 37°C انکوبه شدند. رشد در کشت‌های کنترل و تیمار، هر نیم ساعت یکبار با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری GENESYSTM5 کنترل شد. برای محدود کردن جذب نوری به رشد باکتریایی، جذب نوری محیط‌های کنترل و تیمار در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از MRS مایع و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد بایل بدون تلقیح باکتریایی، صفر شد. رشد به مدت ۷ ساعت دنبال شد و منحنی جذب براساس زمان انکوباسیون رسم گردید. منحنی‌های رشد برای هر سویه رسم و براساس اختلاف

مقدار خود برسند. تمامی این مراحل در زیر هود لامینار و شرایط استریل انجام شد (کالیچیا و همکاران ۱۹۹۳).

غربال جمعیت باکتریایی اولیه و انتخاب سویه‌های مقاوم به اسید

در این مرحله بعد از کشت ۲۴ ساعته، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی نمونه‌های شیر و ماست به بافر PBS با $\text{pH}=3$ تلقیح شدند. سپس نمونه‌های تلقیح شده در بافر PBS به مدت ۲/۵ ساعت در 37°C انکوبه شدند، سپس جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به اسید، باکتری‌های زنده مانده (باکتری‌های مقاوم به اسید) در شرایط اسیدی با استفاده از سانتریفیوژ ترسیب و به محیط کشت MRS مایع، به منظور غنی‌سازی انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 37°C انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با استفاده از سرم فیزیولوژیکی استریل (کلرید سدیم: ۸/۵ گرم بر لیتر) تا ده برابر رقیق شدند و از هر رقت ۱ میلی‌لیتر و به صورت پورپلیت در محیط کشت MRS آگار کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هوازی و در دمای 37°C به مدت ۷۲-۴۸ ساعت انکوبه گردیدند. از پلیت‌های دارای کلنی‌های قابل شمارش، حدود ۱۰ درصد از کلنی‌ها با مورفولوژی متفاوت جداسازی و روی محیط کشت MRS آگار خالص‌سازی شدند، سپس همه سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم و واکنش کاتالاز بررسی شدند. باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی در محیط کشت MRS مایع با ۲۵٪ گلیسرول استریل و ۲۵٪ شیر پس چرخ در دمای 80°C - نگهداری شدند (ارکیلا و پتاچا ۲۰۰۰).

آزمایش‌های میکروبی

تعیین درصد بقای سویه‌ها در شرایط اسیدی معادل با شرایط اسیدی معده

سویه‌های جدا شده، در محیط MRS مایع و در دمای 37°C به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. یک میلی‌لیتر از هر کشت باکتریایی در ۹ میلی‌لیتر PBS با pH برابر با ۲/۵ تلقیح شدند و نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در 37°C

آزمایش‌های مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB و لیزبافر انجام شد. ترکیبات لیزبافر شامل تریس ۱ مولار با ۷/۵ pH=، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار و SDS ۲ درصد و آب مقطر می‌باشد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد در الکتروفورز به کار گرفته شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تکثیر قطعه ژن

16S rRNA

پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه 16S rRNA برای سویه‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 و با کمک توالی‌های 16S rRNA موجود در سایت بانک ژنی NCBI طراحی گردید و واکنش PCR با پرایمرهای (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') LF و (5'AAGGTTACCTCACCGACTTC3') LR اختصاصی سویه‌های لاکتوباسیلوس انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ °C به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ °C به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۷ °C به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با (۱۲/۵ μl) Master mix ساخت شرکت سیناژن، پرایمر مستقیم و معکوس هر کدام (۰/۴ μM) و (۵۰ ng/ μl) DNA و رساندن حجم نهایی واکنش با آب مقطر استریل به حجم به ۲۵ μl انجام شد.

تفکیک قطعات تکثیر یافته

برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌های تکثیر یافته به نسبت ۶ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل مورد نظر توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و نوارهای تکثیر یافته DNA در همه نمونه‌ها به صورت تک نوار و

زمانی در جذب‌های نوری متوالی بین کشت‌های کنترل و تیمار تحلیل شد. این اختلاف برحسب دقیقه بیان و به-عنوان تأخیر در رشد در نتیجه اثر بازدارندگی بایل (نمک‌های صفراوی) در نظر گرفته شد (گیل‌لیند و همکاران ۱۹۸۴).

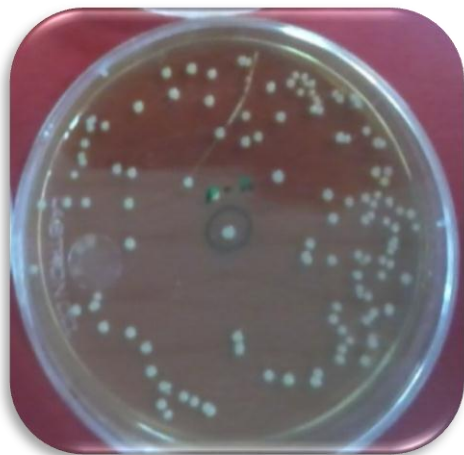
آزمایش‌های بیوشیمیایی

بر اساس روش‌های توصیه شده برگی در کتاب گریته و همکاران (۲۰۰۴) و هولزاپفل و وود (۱۹۹۵) شناسایی مورفولوژیکی سویه‌ها با استفاده از تست کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ °C و رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۶/۵ و ۴ درصد حجمی) - وزنی کلرید سدیم در محیط کشت MRS مایع انجام شد.

تعیین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها

الگوهای تخمیر کربوهیدرات‌ها (۱۷ قند شامل آرابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکارز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز، ملوزیتوز)، برای همه سویه‌ها در محیط کشت MRS مایع دارای معرف فنل قرمز (۰/۵ گرم بر لیتر) تعیین گردید. محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوکز و عصاره گوشت و با افزودن فنل قرمز تهیه گردید. همه قندها به صورت محلول استوک ۵٪ تهیه و به وسیله یک فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر استریل گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر از محلول قندهای استریل به ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه افزوده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و ۵۰ میکرولیتر از کشت فعال به محیط دارای قندهای اختصاصی تلقیح و به منظور مشاهده واکنش‌های تأخیری به مدت ۵ الی ۷ روز در دمای ایزولاسیون (۳۷ °C) انکوبه گردیدند. در پایان مدت انکوباسیون، نتایج بر اساس تغییر رنگ معرف فنل از قرمز به زرد ارزیابی و در حالت مثبت و منفی ثبت گردید (هارینگان و مک کانس ۱۹۷۶).

انکوباسیون سه ساعته در شرایط اسیدی معادل با اسید معده در ادامه آورده شده است.



شکل ۱- کلنی‌های ظاهر شده در محیط کشت MRS آگار

جدول ۱- سویه‌های جداسازی شده از فراورده‌های لبنی

سنتی		نمونه لبنی
سویه‌های	سویه‌های	
انتروکوکوس	لاکتوباسیلوس	
-	L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7	شیر گاومیش خوی
E1, E2, E3, E4, E5, E6	L8, L9, L10, L11, L12, L13	ماست گاومیش خوی
۶	۱۳	کل نمونه‌ها

E* نشان‌دهنده سویه‌های انتروکوکوس و L نشان‌دهنده سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد.

تعیین تحمل به اسیدیته برای تمام ۱۹ سویه، در بافر PBS با pH برابر با ۲/۵ به طول سه ساعت در ۳۷ °C انجام شد که نتایج در جدول ۲ گزارش شده است.

تحقیقات مشابه انجام شده توسط کانوی و همکاران (۱۹۸۷) و فرناندز و همکاران (۲۰۰۳) برای انتخاب سویه‌های لاکتوباسیلوس مقاوم به اسید با استفاده از محتوی معده گزارش شده است. بررسی‌ها نشان دادند که بقای لاکتوباسیلوس‌ها در بافر PBS نسبت به محتوی معده، به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در محتوی معده بر

با اندازه تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام گرفت.

خالص‌سازی محصول PCR

با توجه به دستورالعمل کیت خالص‌سازی از ژل آگارز، محصول PCR تخلیص گردید.

ارسال جهت توالی‌یابی

سویه‌ها در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر به همراه دو پرایمر مستقیم و معکوس (با غلظت‌های ۵۰ پیکومول بر میکرولیتر) در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

نرم‌افزار آماری و بیوانفورماتیکی

نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS13 برای لاکتوباسیلوس‌ها و انتروکوکوس‌ها مورد تجزیه قرار گرفته و گروه‌بندی به عمل آمد. Align مربوط به توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه‌ها با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST در NCBI انجام شد.

نتایج و بحث

از دو محصول شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی، در کل ۱۹ سویه باکتری با پتانسیل پروبیوتیک جداسازی گردید که شامل ۱۳ سویه لاکتوباسیلوس و ۶ سویه انتروکوکوس می‌باشد (شکل ۱). تفکیک سویه‌ها و نامگذاری آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

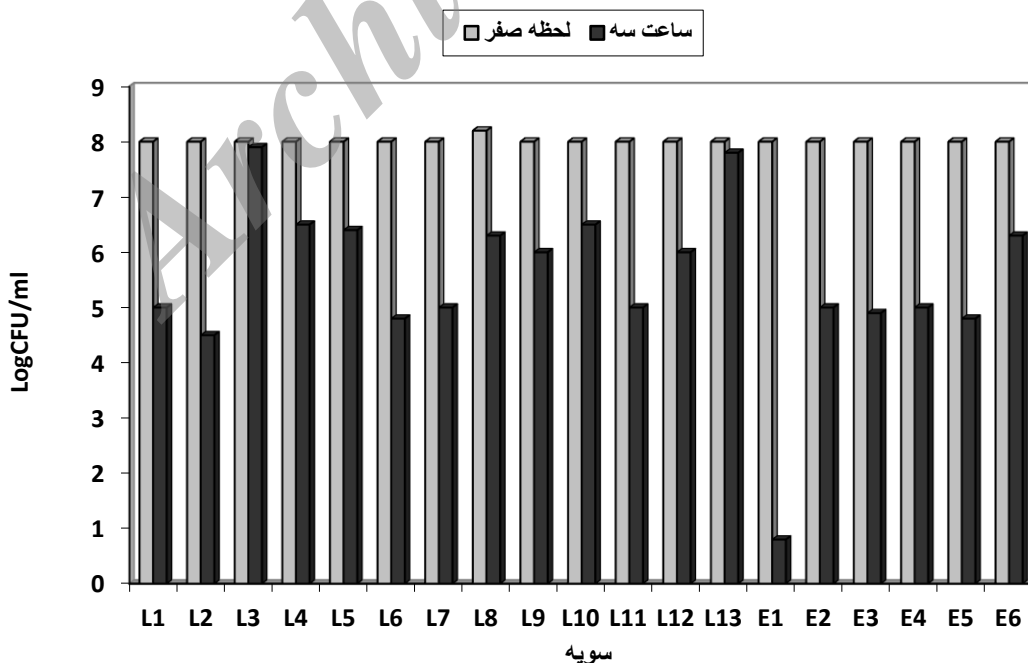
بر اساس درصد بقا، سویه‌ها به ۴ گروه حساس، مقاومت متوسط، مقاومت خوب و مقاومت بسیار خوب تقسیم شدند. بر اساس این نتایج، سویه E1 کمترین مقاومت و ۵ سویه باسیلی شکل و ۴ سویه کوکسی شکل مقاومت متوسط و ۶ سویه باسیلی شکل و ۱ سویه کوکسی شکل مقاومت خوب و دو سویه L3 و L13 مقاومت بسیار خوبی را دارا بودند. شکل ۲ مربوط به شمارش تعداد کلنی سویه‌های باکتریایی، در لحظه تلقیح و بعد از

نظرگرفتن pH آغاز نمود. زیرا می‌توان میکروارگانسیم‌های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارشی رساند. در این زمینه مطالعه‌ای که توسط کیم و همکاران وی (۲۰۰۶) انجام شد، مشخص گردید که میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم به‌طور مؤثر میکروارگانسیم را از تیمار اسیدی و دمایی در موقع انتقال به روده، بدون تأثیر منفی بر روی عملکرد پروبیوتیکی، حفاظت می‌کند.

روی سلول‌های باکتریایی، اندکی پایین‌تر است. آن‌ها بافر PBS با pH مناسب را برای غریبال سویه‌های باکتریایی، به منظور حفظ بقا در شرایط "in vivo" پیشنهاد کردند (کانوی و همکاران ۱۹۸۷). با توجه به اینکه تحمل محیط اسیدی معده، تنها یکی از ویژگی‌های میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک می‌باشد و برای جلوگیری از دست رفتن سویه‌هایی با سایر خصوصیات پروبیوتیکی مثل مقاومت بالا در برابر نمک‌های صفراوی، توانایی کلونیزاسیون به سلول‌های اپیتلیالی روده‌ای و سایر خصوصیات بیولوژیکی مفید می‌توان انجام آزمایش‌ها را بدون در

جدول ۲- تعیین درصد بقای سویه‌ها در pH=۲/۵ به مدت ۳ ساعت

درصد بقا	کمتر از ۱۰٪	بین ۶۰٪ و ۱۰٪	بین ۸۰٪ و ۶۰٪	بیشتر از ۸۰٪
شیر گاو میش خوی	-	L1, L2, L6, L7	L4, L5	L3
ماست گاو میش خوی	E1	L11, E2, E3, E4, E5	L8, L9, L10, L12, E6	L13



شکل ۲- تأثیر محیط اسیدی PBS با pH=۲/۵ در لحظه صفر و بعد از انکوباسیون سه ساعته بر روی بقای سویه‌های جداسازی شده

رشد ایجاد شده به وسیله نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل گردیدند:

۱- سویه‌های مقاوم (دارای تأخیر رشدی مساوی یا کمتر از ۱۵ دقیقه)

۲- سویه‌هایی با تحمل بالا (تأخیر رشدی بین ۱۵ و ۴۵ دقیقه)

۳- سویه‌هایی با تحمل ضعیف (دارای تأخیر رشدی بین ۴۰ و ۶۰ دقیقه)

۴- سویه‌های حساس (تأخیر رشدی بیشتر از ۶۰ دقیقه)
۱۹ سویه منتخب، براساس تأخیر رشد گروه‌بندی شدند که نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

بعد از تعیین مقاومت به اسید، مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد وزنی / حجمی است و برای غریبال سویه‌های مقاوم به صفرا، بحرانی و کافی تلقی می‌شود (پناچیا و همکاران ۲۰۰۴).

ایجاد تأخیر در رشد سویه‌ها با نمک‌های صفراوی، در نتایج براساس پیشنهاد ارایه شده توسط چاتنو و همکاران (۱۹۹۴) که چهار گروه متمایز را براساس تأخیر

جدول ۳- تعیین مقاومت به نمک‌های صفراوی

d \geq 60	40 \leq d \leq 60	15 \leq d \leq 40	d \leq 15	تأخیر رشد برحسب دقیقه
حساس	ضعیف	تحمل بالا	مقاوم	سویه‌ها
			+	L8
		+		L3, L4, L5, L9, L10, L12, L13 E2, E4, E6
	+			L1, L2, L6, L7, L11, E1, E3, E5
+				-

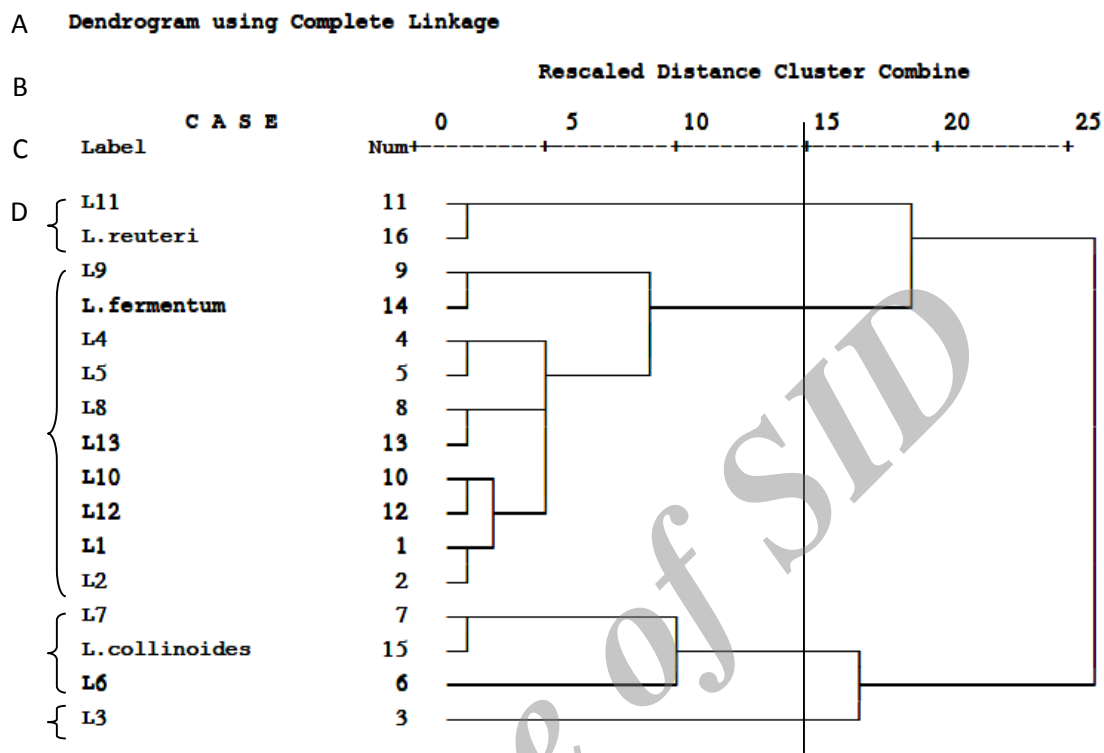
* علامت + نشان دهنده اعضای گروه است.

سویه‌های تیمار داده شده با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل (بدون تیمار) مشهود بود.

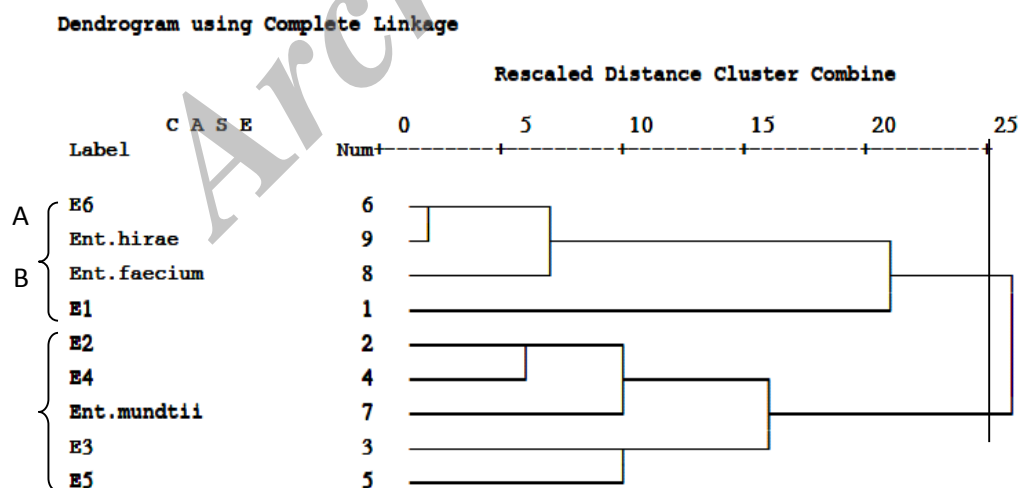
بعد از انتخاب باکتری‌های مقاوم به اسید و تعیین میزان تحمل آن‌ها به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی، شناسایی مقدماتی آن‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. با توجه به مشخصات فنوتیپی، بیوشیمیایی و الگوی تخمیر قندی سویه‌های لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس و رسم دندروگرام مربوطه، لاکتوباسیلوس‌ها با ضریب تشابه ۱۵ درصد در چهار گروه و انتروکوکوس‌ها با ضریب تشابه ۲۵ درصد در دو گروه، قرار می‌گیرند. شکل ۳ دندروگرام حاصل را برای سویه‌های لاکتوباسیلوس و شکل ۴ دندروگرام

در مطالعه‌ای که توسط چاتنو و همکاران (۱۹۹۴) انجام شد، تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد ۲۸ سویه لاکتوباسیلوس استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مورد آزمایش قرار گرفت. نیمی از سویه‌های مورد آزمایش به آرامی تحت تأثیر نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد قرار گرفتند و تأخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به یک جذب نوری ۰/۳ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک‌های صفراوی به نمایش گذاشتند. یافته‌ها در آزمایش سویه‌های انتخاب شده نسبت به نمک‌های صفراوی با یافته‌های موجود در مطالعات قبلی مطابقت داشت. در مورد همه سویه‌های آزمایش شده، تأخیر در رشد

سویه‌های انتروکوکوس را براساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد.



شکل ۳- دندروگرام مربوط به سویه‌های لاکتوباسیلوس



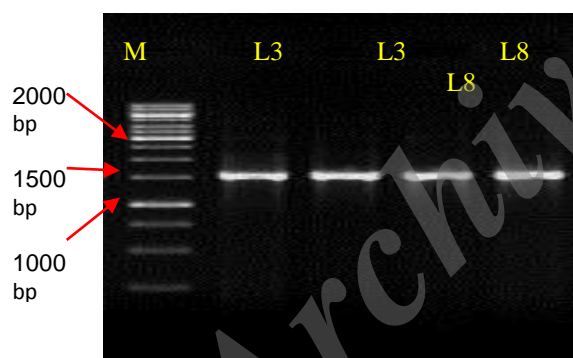
شکل ۴- دندروگرام مربوط به سویه‌های انتروکوکوس

L11 الگوی تخمیر قندی مشابهی با لاکتوباسیلوس رئوتتری نشان داد. گروه B شامل ۹ سویه می‌باشد که

با رسم دندروگرام، سویه‌های لاکتوباسیلوس به چهار گروه A, B, C, D تقسیم‌بندی شدند. در گروه A سویه

کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد. بنابراین شناسایی دقیق‌تر در این تحقیق توسط روش‌های مولکولی و توالی‌یابی انجام گرفته است (آیله و همکاران ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای از پنیر سنتی که در منطقه-ای از ایتالیا ساخته می‌شود، برای انتخاب باکتری‌های استارتر اسید لاکتیک استفاده کردند. با روش‌های شناسایی بیوشیمیایی ۱۱۲ باکتری گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی گردید. شناسایی مولکولی سویه‌ها توسط تکثیر ۳۶۰-۳۸۰ جفت باز از ژن 16S rRNA صورت گرفت (آکولانتی و همکاران ۲۰۰۷).

بر اساس نتایج حاصل از کلاستر بندی تست‌های بیوشیمیایی، دو سویه لاکتوباسیلوس L3 و L8 برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. شکل ۵ نتایج حاصل از نواری بندی تکثیر یافته را در ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید برای دو سویه L3 و L8 در دو تکرار نشان می‌دهد.



شکل ۵- الکتروفورز محصولات تکثیری توالی‌های ژن 16S rRNA برای سویه‌های جدا شده لاکتوباسیلوس

مقایسه‌ها نشان می‌دهد که نتایج توالی‌یابی برای سویه L3 حاکی از تشابه ۱۰۰ درصد ۱۴۵۸ نوکلئوتید با توالی 16S rRNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی برای لاکتوباسیلوس برویس زیرگونه ۸۷۷G بود که سویه L3 در بانک ژنی به ثبت خواهد رسید. نتایج Align در شکل ۶ آورده شده است.

سویه L9 مشابه با لاکتوباسیلوس فرمنتوم و مجموعه سویه‌های L4, L5, L8, L13, L10, L12, L1, L2 با ضریب تشابه ۱۰ درصد از لاکتوباسیلوس فرمنتوم جدا شدند. گروه C شامل دو سویه می‌باشد. سویه L7 کاملاً مشابه با لاکتوباسیلوس کولینویدیس و سویه L6 با ضریب تشابه ۱۰ درصد از لاکتوباسیلوس کولینویدیس مجزا شده است. سویه L3 به تنهایی در گروه D قرار گرفته است و برای شناسایی دقیق‌تر به مرحله مولکولی و توالی‌یابی ارسال شد. با رسم دندروگرام، سویه‌های انتروکوکوس با ضریب تشابه ۲۵ درصد به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه A الگوی رشدی و الگوی تخمیر کربوهیدراتی نزدیکی با انتروکوکوس هیرا و انتروکوکوس فاسیوم نشان دادند. سویه E6 الگوی کاملاً مشابهی با انتروکوکوس هیرا نشان داد و با ضریب تشابه ۷ درصد مشابه با انتروکوکوس فاسیوم می‌باشد. همچنین سویه E1 با ضریب تشابه ۲۱ درصد از این گروه جدا شده است. گروه B شامل چهار سویه E2, E4, E3, E5 می‌باشد که الگوی تخمیر کربوهیدراتی نزدیکی با انتروکوکوس موندتی نشان دادند.

رسولی و همکاران (۱۳۸۸) از پنیر سنتی لیقوان در شمال غرب ایران، با استفاده از روش‌های شناسایی بیوشیمیایی، ۲۰ سویه جداسازی کردند که ۱۹ سویه کاتالاز منفی و تنها یک سویه کاتالاز مثبت بود. سویه‌های غالب شامل انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌باشند.

در تحقیقات مشابه حسنی و همکاران (۱۳۹۰) باکتری‌های لاکتوباسیلوس را از پنیر سنتی لیقوان جداسازی و شناسایی نمودند که در میان سویه‌های جدا شده، گونه‌های غالب متعلق به گونه پلانتروم و گونه کازئی بودند. شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر بر اساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی عدم تکرارپذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز می‌باشد. زیرا علاوه بر متفاوت بودن شرایط

Lactobacillus brevis strain 877G 16S ribosomal RNA gene, JX545342.1**Score=2693bits(1458),Identities=1458/1458(100%)Gaps=0/1458(0%), Strand= Plus/Plus**

Query 6 TGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCACT 65
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 18 TGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCACT 77

Query 66 GATTTCACAACATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAA 125
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 78 GATTTCACAACATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCAGAA 137

Query 126 GCAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGAT 185
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 138 GCAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGAT 197

Query 186 TTTGTTTGAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGCGTATTAGTTAGT 245
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 198 TTTGTTTGAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGCGTATTAGTTAGT 257

Query 246 TGGTGAGGTAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGTAATCGGCC 305
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 258 TGGTGAGGTAAGGCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGTAATCGGCC 317

Query 306 ACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTCCAC 365
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 318 ACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTCCAC 377

Query 366 AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA 425
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 378 AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCCGGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA 437

Query 426 ACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAAGTCAAGGGTTGACGGTATTTAA 485
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 438 ACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAAGTCAAGGGTTGACGGTATTTAA 497

Query 486 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 545
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 498 CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 557

Query 546 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC 605
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 558 GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC 617

Query 606 TTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT 665
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 618 TTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT 677

Query 666 GGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGC 725
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 678 GGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGC 737

Query 726 GGCTGTCTAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA 785
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 738 GGCTGTCTAGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA 797

Query 786 TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTC 845
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 798 TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTC 857

Query 846 AGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT 905
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 858 AGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT 917

Query 906 CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG 965
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 918 CAAAGGAATTGACGGGGGCCCCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG 977

Query 966 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTC1025
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 978 CGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTC1037

Query 1026 GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT1085
 ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
 Sbjct 1038 GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTT1097

```

Query 1086 AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTGG1145
          |||
Sbjct 1098 AAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCTGG1157

Query 1146 TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT1205
          |||
Sbjct 1158 TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT1217

Query 1206 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGGC1265
          |||
Sbjct 1218 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGGC1277

Query 1266 TAAGCTAATCTCTTTAAAGCCGTTCTCAGTTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA1325
          |||
Sbjct 1278 TAAGCTAATCTCTTTAAAGCCGTTCTCAGTTTCGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA1337

Query 1326 AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG1385
          |||
Sbjct 1338 AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG1397

Query 1386 TACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTC1445
          |||
Sbjct 1398 TACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTC1457

Query 1446 GGGAGTCAGCCGTCTAAG 1463
          |||
Sbjct 1458 GGGAGTCAGCCGTCTAAG 1475

```

شکل ۶- Align دو رشته Plus مربوط به توالی یابی ژن 16S rRNA سویه L3 با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی NCBI در BLAST

بلاست توالی 16S rRNA سویه L8 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی نشان داد که این سویه متعلق به لاکتوباسیلوس پلانتروم زیرگونه short با تشابه ۹۹ درصد می‌باشد که توالی این ژن در بانک ژنی به ثبت خواهد رسید. نتایج Align در شکل ۷ آورده شده است.

Lactobacillus plantarum strain short 16S ribosomal RNA gene, [\[HQ259243.1\]](#)

Score= 2678 bits(1450), Identities= 1455/1457(99%)Gaps= 1/1457(0%), Strand= Plus/Plus

```

Query 12 GTGCTATACATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTCGATCATGATTAC 71
          |||
Sbjct 15 GTGCTATA-ATGCAAGTCGAACGAACCTCTGGTATTGATTGGTGCTTCGATCATGATTAC 73

Query 72 ATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGAT 131
          |||
Sbjct 74 ATTTGAGTGAGAGGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGAT 133

Query 132 AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTGA 191
          |||
Sbjct 134 AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTGA 193

Query 192 AAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGT 251
          |||
Sbjct 194 AAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGT 253

Query 252 AACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGA 311
          |||
Sbjct 254 AACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGA 313

Query 312 CTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGA 371
          |||
Sbjct 314 CTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGA 373

Query 372 AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTG 431
          |||
Sbjct 374 AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACCTCTGTTG 433

Query 432 TTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGC 491

```

```

Sbjct 434 |TTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACAGAAAGC| 493
Query 492 CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT 551
Sbjct 494 |CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT| 553
Query 552 TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCA 611
Sbjct 554 |TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCA| 613
Query 612 ACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCA 671
Sbjct 614 |ACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCA| 673
Query 672 TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG 731
Sbjct 674 |TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG| 733
Query 732 GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT 791
Sbjct 734 |GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT| 793
Query 792 AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTCTGCA 851
Sbjct 794 |AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTCTGCA| 853
Query 852 GCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT 911
Sbjct 854 |GCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT| 913
Query 912 TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC 971
Sbjct 914 |TGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC| 973
Query 972 TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATG1031
Sbjct 974 |TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATG1033
Query 1032 GATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC1091
Sbjct 1034 |GATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC1093
Query 1092 AACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGC1151
Sbjct 1094 |AACGAGCGCAACCCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGC1153
Query 1152 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG1211
Sbjct 1154 |CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGG1213
Query 1212 GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAAT1271
Sbjct 1214 |GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAAT1273
Query 1272 CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT1331
Sbjct 1274 |CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT1333
Query 1332 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG1391
Sbjct 1334 |CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCG1393
Query 1392 CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCA1451
Sbjct 1394 |CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCA1453
Query 1452 GCCGCTAAGTGAACAAG 1468
Sbjct 1454 |GCCGCTAAGTGAACAAG| 1470

```

شکل ۷- Align دو رشته Plus مربوط به توالی یابی ژن 16S rRNA سویه L8 با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی NCBI BLAST

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که شیر سنتی و ماست تولید شده به روش سنتی منبع مهمی برای باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. بنابراین جداسازی و استفاده از این باکتری‌ها به عنوان استارتر به پنیر و ماست‌های صنعتی این امکان

را فراهم خواهد کرد که محصولات لبنی با ویژگی‌های مطلوبی از نظر کیفیت به بازار عرضه شده و مصرف-کنندگان راه جدیدی برای بهره‌مندی از سلامتی خود خواهند یافت، زیرا مصرف این باکتری‌ها می‌تواند سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشد و سیستم ایمنی را تقویت کند.

منابع مورد استفاده

- حسنی م، حصاری ج، فرج‌نیا ص، مقدم واحد م، ۱۳۹۰، بررسی خواص تکنولوژیکی گونه‌های لاکتوباسیل غالب در پنیر سنتی ليقوان، فصلنامه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۱ (۴)، ۵۴۵-۵۳۵.
- رسولی پیروزیان ه، حصاری ج، فرج‌نیا ص، مقدم م، قیاسی فر ش، ۱۳۸۸، جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروکوکسی غالب در پنیر سنتی ليقوان، فصلنامه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱۹ (۱)، ۱۳-۲۴.
- Aquilanti L, Silvestri G, Zannini E, Osimani A, Santarelli S and Clementi F, 2007. Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. *Journal of Applied Microbiology* 103(4): 948- 960.
- Ayele N, Siv A and Goran M, 2001. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. *Antonie van Leeuwenhoek* 79: 1-6.
- Brien J, Crittenden R, Arthur C and Salminen S, 1999. Safety evaluation of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 10(12): 418- 424.
- Bulut C, 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. IYTE Thesis of MS.
- Çakir I, 2003. Determination of some probiotic properties on *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Ankara University, Ph.D thesis of 88- 95.
- Calicchia ML, Wang CIE, Nomura T, Yotsuzuka F and Ostato DW, 1993. Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and streptomycin resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product. *Journal of Food Protection* 56: 954-957.
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L and Collins JK, 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology* 35: 1- 27.
- Chateau N, Deschamps AM and Hadj Sassi A, 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology* 18: 42- 48.
- Conway PL, Gorbach SL and Goldin BR, 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70: 1- 12.
- Durme C, Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D and Hallorari S, 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *In vivo* findings. *Clinical Nutrition* 73(2): 386- 392.
- Erkkila S and Petaja E, 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science* 55: 297-300.
- Fernandez MF, Boris S and Brbes C, 2003. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 94: 449- 455.
- Garrity G, Boone M, David R and Richard W, 2004. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 4th Ed. Springer pub. Michigan.
- Gilliland SE, Staley TE and Bush LJ, 1984. Importance of the bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *Journal of Dairy Science* 67: 3045- 3051.

- Harrigan WF and Mc Cance ME, 1976. Biochemical test for bacteria laboratory method in food and dairy microbiology. Academic Press. London. New York 33- 200.
- Holzapfel WH, Guigas C and Franz C, 2002. General overview of the *Enterococci*. International Symposium on Enterococci in Foods 30- 31.
- Holzapfel WH, Haberer P, Snell J, Schillinger U and Huisint Veld J, 1998. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology 41: 85- 101.
- Hozapfel WH and Wood BJB, 1995. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional. Glasgow 235- 278.
- Klaenhammer TR, 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. Nutrition Journal 130: 415S- 416S.
- Kim S, Yong Cho S, Song O, Shin IS, Su Cha D and Park H, 2006. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. Food Science and Technology 41(3): 493- 500.
- Metchnikoff E, 1907. The prolongation of life. Optimistic studies. London: Butterworth- Heineman 161- 183.
- Pennacchia C, Ercoloni D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G and Villani F, 2004. Selection of *Lactobacillus* Strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science 67: 309- 317.
- Prasad J, Gill H, Smart J and Gopal PK, 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. International Dairy Journal 8: 993-1002.
- Salminen S, Bouley C, Boutron MC, Cummings JH, Franck A and Gibson GR, 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition 80(1): S147- S171.

Archive of SID

Isolation, biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoi city

T Narimani¹ and A Tarinejad^{2*}

Received: August 21, 2013

Accepted: April 15, 2014

¹ MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

² Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

*Corresponding author: E mail: atarinejad@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was to isolate and identify the probiotic bacteria from microbial flora of buffalo milk and its traditional yogurt in Khoi city. To achieve this goal, the lactic acid bacteria were isolated by phenotypic methods (cellular morphology, Gram staining, catalase test, biochemical tests including growth in different temperatures, various concentrations of salt and fermentation of different types of sugar) and their probiotic potential (resistant to stomach acid and bile salts) were evaluated. Then, to identify more accurately, the 16S rRNA gene of bacteria were replicated with pairs of specific primers and then the purified PCR product was sent for gene sequencing. At the end, 13 strains of *Lactobacilli* and 6 strains of *Enterococci* were reported as the natural microbial flora with probiotic potential in Khoi city. These bacteria provide the good quality of the dairy products in those areas and can be used in industrial manufacture of dairy products.

Key words: *Enterococci*, *Lactobacilli*, Probiotic Bacteria, 16S rRNA gene