Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 4 (02-2016)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Identification and Characterization of Probiotic Properties of Indigenous Lactic Acid Bacteria Based on Their Phenotypic and Genotypic Characteristics

Malihe Haji Ghasemi[1] , Naheed Mojgani[2]

1. Department of Biology, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Iran.

2. Department, Razi vaccine and serum research institute, karaj, IR Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2014/12/03
Accepted: 2015/08/23
Available online:2016/01/10

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 1394; 9(4): 47-54

Corresponding author at:
Malihe Haji Ghasemi

Department of Biology, Ashkezar Branch, Islamic Azad University, Ashkezar, Iran.

Tel:
+98 939 2791085
Email:
m.hg52@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Probiotic are live microbial food supplement which bestows beneficial effects on the host by creating intestinal microbial balance. In this research, we aimed to identify locally isolated Lactic Acid Bacteria (LAB) with probiotic potentials by phenotypic and genotypic methods.

Materials and Methods: A number of locally isolated LAB identified by phenotypic characteristics were selected and screened for their probiotic properties. The isolates were tested for their acid and bile resistance, antibacterial activity, cholesterol reducing. The selected probiotic LAB were identified to species level by using universal primers and 16S rRNA sequencing.

Results: Among the 20 LAB isolates, only 3 isolates resisted low pH value of 2.5, while 5 isolates resisted 0.3 to 1% bile salt. Among these 5 isolates, 3 isolates showed the ability to lower cholesterol significantly as they reduced 94.8, 95.73 and 97.82 % of cholesterol within 2 hours of incubation. Based on 16S rRNA sequencing these 5 isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* (22SN, 24SN, NPN0022, 10SN), and *Lactobacillus rhamnosus* (30SN).

Conclusions: The LAB isolates in this study possessed significant probiotic properties and might be used as a probiotic in human, livestock, and poultry products in the future.

Key Words: Probiotic, Lactic Acid Bacteria, PCR, 16S rRNA.

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Ar

How to cite this article:

Hajighasemi M, Mojgani N. Identification and Characterization of Probiotic Properties of Indigenous Lactic Acid Bacteria Based on Their Phenotypic and Genotypic Characteristics. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :47-54

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۹ – شماره ۴– زمستان ۱۳۹۴
Journal homepage: www.ijmm.ir

شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک بومی بر اساس ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی

ملیحه حاجی قاسمی[۱]، ناهید مژگانی[۲]

۱.گروه زیست شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، اشکذر، ایران.
۲.بخش بیوتکنولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۱۲
پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۰۱
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰
موضوع:
میکروبیولوژی مواد غذایی
IJMM 1394; 9(4): 47-54

نویسنده مسئول:
ملیحه حاجی قاسمی
گروه زیست شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی
تلفن: ۰۹۳۹۲۷۹۱۰۸۵
پست الکترونیک:
m.hg52@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک ها مکمل های غذایی میکروبی هستند،که با ایجاد تعادل میکروبی روده اثرات مفیدی بر روی میزبان می گذارند .در این مطالعه، هدف ما شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک بومی بر اساس ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی است.

مواد و روش ها: تعدادی از باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از محصولات لبنی براساس ویژگی های فنوتیپی شناسایی و سپس جهت ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه ها از نظر مقاومت به اسید و نمک صفرا، فعالیت ضد میکروبی، کاهش کلسترول مورد آزمایش قرار گرفته و آنهایی که به عنوان پروبیوتیک شناسایی شدند به وسیله‌ی پرایمر های عمومی ۱۶SrRNA تعیین توالی و در سطح گونه شناسایی و ثبت گردیدند.

یافته‌ها: از ۲۰ نمونه باکتری های اسید لاکتیک جدا شده، ۳ نمونه نسبت به شرایط اسیدی (pH ۲/۵) و ۵ نمونه به درصد های متفاوت نمک صفرا (۰/۳-۱) مقاوم بودند. از بین این ۵ نمونه، ۳ نمونه به طور قابل توجهی توانایی کاهش کلسترول در عرض ۲ ساعت انکوباسیون به میزانهای ۵۹/۳۷، ۴۹/۸ و ۷۹/۲۸ درصد را نشان دادند. در انتها ۵ نمونه براساس ۱۶SrRNA تعیین توالی و به عنوان *Lactobacillus plantarum* (NPN ۰۰۲۲, ۲۲ SN، ۲۴ SN، ۱۰SN) و *Lactobacllus rhamnosus* (۳۰ SN) شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: باکتری های اسید لاکتیک جدا شده در این مطالعه دارای خواص پروبیوتیکی بوده و می توانند در آینده به عنوان پروبیوتیک در محصولات انسانی و دام و طیور مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: باکتری های اسید لاکتیک، پروبیوتیک ، 16S RNA ribosomal، واکنش زنجیره ای پلیمراز

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

پروبیوتیک ها مکمل های غذایی میکروبی زنده ای هستند که از طریق بهبود توازن فلور میکروبی روده اثرات مفیدی بر روی سلامت مصرف کننده دارند (۱). این گروه از باکتری ها در قسمت های مختلف بدن به ویژه دهان، دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تناسلی نقش مهمی در بازدارندگی عفونت ها دارند (۲). از میان میکروارگانیسم های پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیک به عنوان مهمترین گروه شناخته می شوند. باکتری های اسید لاکتیک گرم مثبت، فاقد اسپور و کاتالاز منفی هستند که محصول اصلی ناشی از تخمیر قند توسط آن ها اسید لاکتیک می باشد. این باکتری ها اولین بار از شیر جداسازی شدند و به صورت گسترده به عنوان کشت آغازگر در صنایع لبنی، گوشت، سبزی ها و غلات به کار می روند (۴-۲). بسیاری از گونه های باکتری های اسید لاکتیک به طور کلی به عنوان ایمن شناخته شده (GRAS) و چندین گونه باکتری های اسید لاکتیک نیز توسط مقامات ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA) ایمن شناخته شده اند (۵). پروبیوتیک ها به منظور ایجاد اثرات سودمند در بدن باید قادر به رشد در معده و روده بوده و توانایی اتصال به دیواره روده و سکونت در آنجا را نیز داشته باشند. به همین منظور باید مقاومت لازم جهت مواجهه شدن با اسید کلریدریک معده و نمک های صفراوی موجود در روده کوچک در آنها وجو داشته باشد (۶).

www.SID.ir

دانش زیادی جهت استفاده از باکتری ها به عنوان پروبیوتیک مورد نیاز می باشد. این باکتری ها باید به تعداد کافی و به صورت زنده، در محصول وجود داشته و در طول مدت زمان نگهداری پایداری ژنتیکی خود را از دست ندهند. در سال های اخیر مصرف چنین محصولاتی به دلیل اثرات سلامت بخش باکتری های اسید لاکتیکی افزایش یافته است (۷). بررسی پتانسیل پروبیوتیکی در سویه های بومی با استفاده از روش های بیوشیمیایی زمان بر و پر هزینه است و با توجه به ناشناخته بودن بسیاری از زیست بوم ها، خصوصاً از نظر ایمنی سویه ها، نیازمند انجام تحقیقات اصولی است تا بتوان در اولین گام بانک میکروبی قابل قبولی از مناطق بکر ایران ایجاد کرد و در مراحل بعد با بررسی ویژگی های سویه ها، به سوی استفاده‌ی صنعتی از آنها حرکت کرد، لذا در جهت تحقق این هدف، لازم است پس از گردآوری مجموعه ای میکروبی با شناسایی دقیق آنها با استفاده از روش های مولکولی به بررسی بعضی از خصوصیات پروبیوتیکی آنان با استفاده از روش های میکروبی پرداخت و همان گونه که در شرح موضوع تحقیق ارائه گردید، لازم است از یک سو با توجه به تنوع ژنتیکی کشور و از سوی دیگر واردات سویه هایی تحت عنوان پروبیوتیک به کشور، سویه های بومی پروبیوتیک شناسایی و ارزیابی شوند و کاربرد آنها در صنعت مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی خواص و اثرات پروبیوتیکی تعدادی سویه ی بومی جهت کاربردهای آتی در صنعت پروبیوتیک کشور است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها

در این مطالعه از باکتری های اسیدلاکتیک که قبلاً از محصولات لبنی جدا شده بودند، استفاده شد. ۲۰ سویه از این نمونه های انتخاب شده بر اساس خصوصیات فنوتیپی شامل رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز (گرم مثبت و کاتالاز منفی) جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند.

گونه های باکتری و شرایط کشت

در این تحقیق از محیط مایع MRS (*deMan, Rogosa and Sharpe, HiMedia, India*) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط هوازی جهت کشت و رشد باکتری های اسید لاکتیک، و از محیط مایع BHI (*Brain Heart Infusion Broth, HiMedia, India*) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴- ۱۸ ساعت تحت شرایط هوازی جهت کشت و رشد باکتری های بیماریزا استفاده شدند.

بررسی مقاومت به اسید باکتری های اسید لاکتیک

به منظور بررسی مقاومت باکتری های اسید لاکتیک به اسید، از محیط مایع MRS استریل که به کمک اسید کلریدریک (HCL) ۱۰ نرمال و سود (NaOH) ۱۰ نرمال ، pH آن ها به ترتیب به ۲، ۲/۵، ۳، ۴ و۶/۵ رسانده شده بود، استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های تازه کشت شده به این محیط ها منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و در زمان های صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۲۴ ساعت رشد باکتری ها از طریق خواندن جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر بررسی شد (۹, ۸).

بررسی مقاومت به نمک صفرا در باکتری های اسید لاکتیک

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های تازه رشد کرده به محیط های MRS مایع حاوی ۰/۳، ۰/۷ و ۱ درصد نمک صفراوی استریل اضافه شد، سپس رشد باکتری ها در زمان صفر، ۲، ۴ و ۸ ساعت از طریق خواندن جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. میزان بازدارندگی رشد با استفاده از روش شرح داده شده توسط Gopal و همکاران در سال ۲۰۰۱ محاسبه شد. (۱۱-۸).

$$Cinh = \frac{(\Delta T8-T0\ control-\Delta T8-T0\ treatment)}{\Delta T8-T0\ control}$$

بررسی خاصیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک

روش حفره ای

این روش یکی از معمول‌ترین روشهای مورد استفاده به منظور تشخیص فعالیت ضدمیکروبی است. در این روش از سوسپانسیون ۰/۵ مک فارلند تهیه شده از کشت تازه ی باکتری پاتوژن مورد بررسی به میزان ۱۰۰ µl درون محیط نیمه جامد MRS حاوی ۱٪ آگار تلقیح کرده و روی محیط جامد MRS در پلیت ریخته می شود. سپس با کمک ابزار مخصوص چاهک هایی درون آن ایجاد و از کشت مایع شبانه ی باکتری اسید لاکتیک مورد مطالعه به میزان ۱۵۰µl درون حفرات ایجاد شده اضافه می شود و درون انکوباتور قرار می گیرد. نتایج پس از ۱۸-۲۴ ساعت به صورت هاله ی عدم رشد خوانده می شود. هاله های دارای قطر بیش از ۱۵ میلی متر مثبت در نظر گرفته می شوند.

اثر ضد میکروبی باکتری های اسیدلاکتیکی منتخب، بر علیه باکتری های بیماری زای: *Salmonalla typhi* (بومی)، *Psedomonas aeruginosa* (*RTCC*۱۴۸۳)، *Kleb-siella peneumonia* (*RTCC*۱۲۵۴)، *Escherichia coli* (*RTCC*۱۱۷۴) و *Staphylococcus aureus* (*RTCC*۱۲۴۰) با استفاده از روش حفره‌ای سنجیده شد (۱۴-۱۲).

بررسی هیدرولیز نمک صفرا در باکتری های اسید لاکتیک

به منظور بررسی خاصیت هیدرولیز نمک صفرا در باکتری های اسید لاکتیک از محیط (MRS Agar + ۰.۵ ٪ v/w

Archive of SID
www.SID.ir

Taurodeoxycholic + ۰.۰۳۵ ٪ Cacl۲ v/w) استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های تازه کشت شده به صورت خطی بر روی محیط مذکور کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در شرایط بی هوازی نگه داری شدند. اثر فعالیت هیدرولیز نمک صفرا با ایجاد رسوب سفید رنگ در اطراف کلنی ها مورد مطالعه قرار گرفت (۱۴).

بررسی فعالیت هیدرولیز ال – آرژینین

به منظور انجام تست هیدرولیز ال – آرژینین در باکتری های اسید لاکتیک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از کشت تازه ی باکتری را به محیط مایع حاوی ۰/۳ درصد اسید آمینه ال – آرژینین منتقل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری می کنیم. پس از پایان انکوباسیون شبانه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر (Nessler's Reagent) قرار گرفت و تغییر رنگ بررسی شد.

ایجاد رنگ نارنجی متمایل به قرمز نشان دهنده ی واکنش مثبت است. از *استافیلوکوکوس اورئوس* (RTCC۱۲۴۰) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

بررسی کاهش کلسترول به وسیله باکتری ها

به این منظور محیط کشت MRS مایع به طور جداگانه استریل شد. سپس کلسترول محلول با غلظت نهایی ۱ درصد به مایع MRS حاوی ۰/۳ درصد نمک صفرا اضافه شد. از باکتری های تازه کشت شده به میزان ۲۰۰ lμ به محیط کشت فوق تلقیح و بعد از ۲، ۴ ، ۸ و ۲۴ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جذب آن ها در ۵۴۶ نانومتر خوانده شد. شاهد مورد استفاده محیط MRS حاوی ۰/۳ بود. در نهایت میزان کلسترول باقی مانده در محیط از فرمول زیر بدست آمد (۱۶, ۱۵).

$$\text{میزان کلسترول} = \frac{\text{غلظت اولیه} - \text{غلظت ثانویه}}{\text{غلظت اولیه}} \times ۱۰۰$$

شناسایی مولکولی ایزوله های پروبیوتیک

برای شناسایی ایزوله های پروبیوتیکی به روش مولکولی، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در تشخیص جنس لاکتوباسیل ها که از 16S rRNA طراحی شدند عبارتند از: Lacb(F):TGCCTAATACATGCAAGT و Lacb(R):CTTGTTACGACTTCACCC دمای دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان ۵ دقیقه بود. سپس سی سیکل شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA نگه داشته شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شدند که مشاهده ی باند ۱۵۰۰ bp به معنی تعلق باکتری به جنس *لاکتوباسیلوس* بود.

نتایج

در این بررسی نمونه های *Lactobacillus* جدا شده از محصولات لبنی، از نظر ویژگی هایی فنوتیپی (شکل ۱) (رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز)، گرم مثبت و کاتالاز منفی، بودند. تمامی سویه های مورد بررسی در این مطالعه، قادر به رشد در هر دو pH مذکور بودند، دو سویه ی NPN ۰۰۲۲، SN ۳۰ بیشترین میزان رشد در pH ۲/۵ در تمامی زمان ها و سه سویه ی NPN ۰۰۲۲، SN ۳۰ و SN ۱۰ نیز در pH ۴ بیشترین میزان رشد را داشتند، در حالیکه سویه SN۱۰ پس از گذشت ۳ ساعت قادر به رشد در pH ۲/۵ بود (نمودار ۱). همچنین نتایج ارزیابی مقاومت به نمک های صفراوی نشان داد، پس از بررسی اثر بازدارندگی در میان۵ جدایه اسید لاکتیک انتخاب شده، جدایه هایی که اثر بازدارندگی آنان بین (۰/۴<Cinh<۰/۲) باشد دارای مقاومت خوبی می باشند. هر ۵ سویه قادر به تحمل ۰/۳ و ۰/۷ درصد نمک صفرا در طی زمان های ۲، ۴، ۸ و ۲۴ بوده اند، در حالیکه دو سویه۲۴ SN و ۳۰ SN در زمان های ۲و ۴ ساعت توانایی رشد در ۱٪ درصد نمک صفرا را نداشتند. در این میان سویه های ۳۰ SN و NPN ۰۰۲۲ بیشترین میزان رشد را در هر دو غلظت نمک صفرا داشتند. در بررسی فعالیت ضد میکروبی مشخص شد که سویه های ۲۲ SN ، ۲۴ SN و ۱۰ SN علیه پاتوژن های *S.typhi* و *K.pneumoniae* ، و سویه های ۲۴ SN، ۲۲ SN و NPN ۰۰۲۲ علیه *E.coli* ، ۳۰ SN به *P. aeruginosa* و سویه NPN ۰۰۲۲ علیه *S. aureus* فعالیت ضد میکروبی داشته و باعث ایجاد هاله های شفاف اطراف حفره ها شدند.

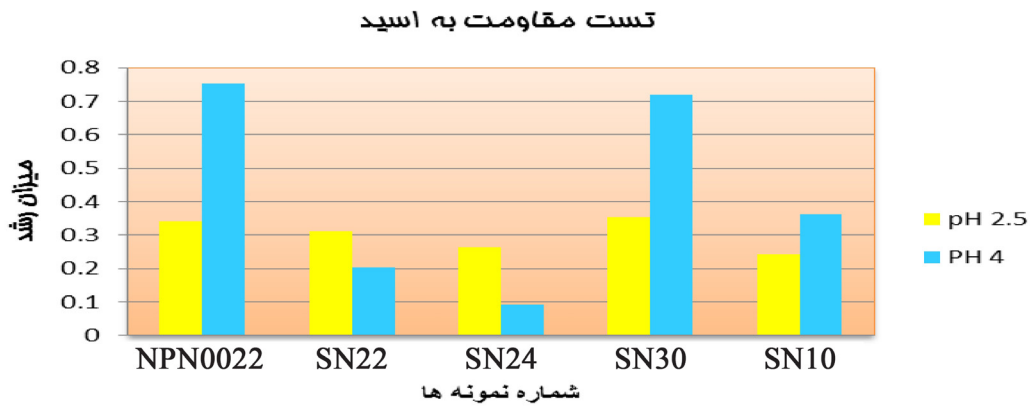
در بررسی هیدرولیز ال-آرژینین و نمک صفرا، نیز مشاهده شد، که سویه های ۱۰ SNو ۳۰ SN قادر به هیدرولیز ال-آرژینین و نمک صفرا، سویه ۲۲ SN فقط قادر به هیدرولیز ال-آرژینین و سویه ی NPN ۰۰۲۲ فقط قادر به هیدرولیز نمک صفرا بودند.

نتایج کاهش کلسترول نشان داد که هر ۵ سویه قادر به کاهش کلسترول بوده، و بیشترین میزان کاهش توسط سویه SN ۲۴، ۲۲ SN و NPN ۰۰۲۲ به میزان ۹۷/۸۲ درصد و کمترین میزان توسط سویه ۳۰ SN به میزان ۸۷/۲۶ در زمان ۸ ساعت، بوده است (نمودار ۲).

پس از بررسی ویژگی های پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک، از میان ۲۰ سویه، ۵ سویه به عنوان بهترین نمونه ها

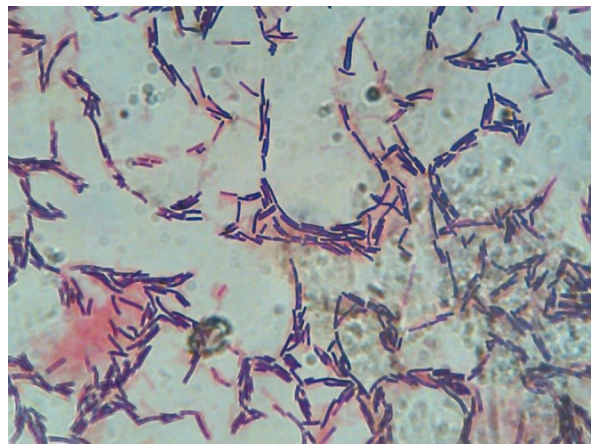
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره‌ی ۱: بررسی میزان مقاومت به اسید در pH ۲،۵ و pH ۴ در زمان ۴ ساعت

نمودار شماره‌ی ۲: کاهش کلسترول توسط سویه های انتخابی در زمان ۸ ساعت



تصویر شماره‌ی ۱: لام تهیه شده از سویه SN ۲۲ با بزرگ نمایی x۱۰۰ (رنگ آمیزی گرم)

انتخاب شدند. هر ۵ سویه با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز ۱۶S rRNA و با استفاده از پرایمرهای عمومی LacbF و LacbR تعیین توالی شدند. نتایج بدست آمده با استفاده از ابزار BLAST (blast.ncbi.nim.nih.gov) در حد گونه شناسایی و ثبت گردیدند. طبق نتایج BLAST تمامی نمونه ها دارای مشابهت بین ۹۹-۹۸ درصد در حد گونه طبقه بندی شدند. ۴ سویه به شـــــماره های (SN ۲۲، SN ۲۴ ، NPN ۰۰۲۲ و SN ۱۰) به عنـــوان *L.plantarum* و سویه SN ۳۰ به عنوان *L.rhamnosus* شناسایی شدند.

بحث

از مهمترین معیارهای انتخابی باکتری های پروبیوتیک می توان مقاومت به pH اسیدی ، نمک صفرا، کاهش کلسترول، فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن ها و داشتن پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی را اشاره کرد(۱۷). یکی از مهم ترین فاکتورهای اثر بخشی این میکروارگانیسم ها عبور از موانع فیزیکی و شیمیایی مانند اسید و نمک صفرا موجود در دستگاه گوارش است (۱۷). طبق گزارش Chan و همکارانش در سال ۲۰۱۱ ، اسید هایی مانند اسید هیدروکلریدریک که در معده انسان نیز یافت می شود، به شدت اکسید کننده بوده و باعث از بین رفتن مولکول های زیستی سلول مانند اسیدهای چرب، پروتئین ها و مولکول های DNA می شود. کاهش pH محیطی می تواند باعث مهار متابولیسم و کاهش رشد و زنده مانی لاکتوباسیل ها شود (۱۸). خصوصیت مقاومت به اسید در لاکتوباسیل ها علاوه بر پایداری شان در معده ، بلکه در بقای آن ها در غذاهای اسیدی نیز اهمیت دارد (۱۹). طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، سویه های *پلانتاروم* و *رامنوسوس* مورد

Archive

www.SID.ir

بررسی قادر به تحمل و رشد در pH های مختلف در طی زمان های مذکور بودند. مشابه این بررسی توسط Cebeci و همکارانش در سال ۲۰۰۲ بر روی مقاومت به شرایط اسیدی انجام شد(۲۰). طبق گزارش Narimani و همکارانش در سال ۱۳۹۴ سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جدا شده از محصولات لبنی سنتی تنها توانایی مقاومت و رشد در pH ۲/۵ بعد از گذشت ۳ ساعت را داشته اند(۲۱). در حالیکه سویه های *پلانتاروم و رامنوسوس* مورد بررسی در این مطالعه توانایی رشد در همین pH بعد از گذشت ۲۴ ساعت را نیز از خود نشان دادند. برخلاف مطالعات انجام شده، Succi و همکارانش گزارش کردند که *رامنوسوس* بعد از قرار گرفتن در pH ۲ به مدت ۲ ساعت انکوباسیون کاهش رشد داشته است (۲۲).

باکتری های پروبیوتیک باید توانایی زنده ماندن در دستگاه گوارش را به مدت ۴ ساعت یا بیشتر داشته باشند. میزان زنده مانی باکتری های پروبیوتیک در روده ی کوچک به مقاومت آنها در برابر نمک های صفراوی بستگی دارد (۲۳). پس از قرار گرفتن باکتری ها در معرض نمک های صفراوی، اختلالات هومئوستازی سلولی اتفاق می افتد. تجزیه ی غشای لیپیدی و پروتئین های غشای سلولی، باعث نشت محتویات باکتریایی و در نهایت مرگ سلولی می شود (۲۴). مقاومت بعضی سویه ها به نمک صفراوی با فعالیت هیدرولازی نمک صفراوی مرتبط است، بدین صورت که هیدرولیز نمک صفراوی منجر به کاهش سمیت و اثرات جانبی نمک صفراوی می شود. Peymanfar و همکارانش در سال ۱۳۸۷ گزارش کردند، لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از علوفه های سیلو شده ذرت و سبوس توانایی تحمل ۰/۳ و ۰/۵ درصد نمک صفرا را نداشته (۲۷)، در حالیکه سویه های پلانتاروم جدا شده از محصولات لبنی در این مطالعه توانایی تحمل ۰/۳ و ۰/۵ درصد نمک صفرا و حتی ۱ درصد آن را نیز داشتند. مشابه این بررسی توسط Chartieties در سال ۱۹۹۸ بر روی مقاومت به شرایط اسیدی و نمک های صفراوی انجام شده است (۲۶).

استفاده از پروبیوتیک ها در کاهش سطح کلسترول خون سال هاست که مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است. مطالعات متعددی نشان می دهد که بسیاری از گونه های *لاکتوباسیلوس* قادر به کاهش کلسترول هستند و سطح کلسترول خون با خطر بیماری های قلبی در ارتباط است. کاهش کمی در میزان کلسترول تا حدود ۱٪ خطر بیماری قلبی را تا حدود ۲ تا ۳ ٪ کاهش می دهد. Tsai و همکارانش در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که سویه های پلانتاروم جداسازی شده تنها قادر به کاهش ۴۵درصد کلسترول بوده (۲۸)، در حالیکه سویه‌های پلانتاروم انتخاب شده در این مطالعه همگی قادر به کاهش کلسترول در طی زمان های مورد بررسی بودند. سه سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ۹۷/۸۲ درصد بیشترین میزان کاهش را از خود نشان دادند و امید است که بتوان از آنها جهت کاهش کلسترول در شرایط *in vivo* نیز استفاده شود.

باکتری های پروبیوتیک برای اثر گذاشتن بر فلور میکروبی روده باید توانایی مقابله با پاتوژن ها از طریق کاهش pH، تولید مواد ضد میکروبی (باکتریوسین ها)، یا رقابت با آن ها را داشته باشند. متابولیت هایی با وزن مولکولی کم (مانند هیدروژن پراکسید، لاکتیک اسید و استیک اسید) و متابولیت های ثانویه نقش مهمی در مهار باکتری های بیماری زا مانند *سالمونلا* و *اشریشیا کلی*، دارند (۲۹). در این مطالعه هر ۵ سویه توانستند در مقابل سویه های بیماری زا مورد بررسی اثر ممانعت کنندگی خوبی از خود نشان دهند. Olart و همکارانش در سال ۲۰۰۰ گزارش کردند که باکتری *رامنوسوس و پلانتاروم* بیشترین اثر ضد میکروبی خود را بر روی *سالمونلا تیفی* و *کلبسیلا پنومونیه* دارند در حالیکه سویه های مورد بررسی در این پژوهش اثر ضد میکروبی نسبت به پاتوژن های *سالمونلا تیفی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. Ogunbanwo و همکارانش فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین ها را توسط *لاکتوباسیلوس* ها مورد بررسی قرار دادند. آن ها با استفاده از روش چاهک نشان دادند که لاکتوباسیل ها از جمله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از رشد *اشریشیاکلی* (۸-۶ میلی متر) و *باسیلوس سرئوس* (۱۰-۸ میلی متر) جلوگیری می کنند (۳۰). Boris و همکارانش نشان دادند که *لاکتوباسیلوس* های جدا شده از لبنیات اثر مهارکنندگی برروی *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشربشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* دارند (۳۲).

به طور کلی از میان نمونه های باکتری اسید لاکتیک جدا شده از محصولات لبنیات بومی ،۵ سویه دارای خصوصیات پروبیوتیکی شامل تحمل اسید، نمک صفرا ،کاهش کلسترول در شرایط آزمایشگاهی و توانایی ممانعت از رشد باکتری های بیماریزا بودند. در حال حاضر، تولید تجاری محصولات پروبیوتیک برای استفاده در محصولات غذایی مورد استفاده انسان و همچنین در تغذیه دام و طیور وسعت جهانی یافته و روز به روز به استفاده از آنها افزوده می‌شود. در ایران نیز استفاده از پروبیوتیک ها رو به گسترش است و شناسایی و ارایه باکتری های اسید لاکتیک پروبیوتیکی بومی می تواند در بهبود زنجیره ی غذایی کشور موثر باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در موسسه واکسن و سرم سازی رازی البرز انجام شده است و بدین وسیله از تمام کسانی که در اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند سپاسگزاری می شود. از جناب آقای خوشنود و آقای آذری نیز به پاس تمامی زحمات و کمک هایشان نیز قدردانی می شود.

Archive of SID
www.SID.ir

Reference

1. Tannock G, Munro K, Harmsen H, Welling G, Smart J, Gopal P. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing Lactobacillus rhamnosusDR20. AEM. 2000;66(6):2578-88.

2. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents–physiological effects and clinical benefits. APT. 2005;22(6):495-512.

3. Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat science. 2003;65(2):859-67.

4. Purohit S, Sharma R, Jodhawat N, Kaur S. Evaluation of probiotic potential of Lactobacillus ferementum strain. Int J Pharm Sci Rev Res. 2012;14(2).

5. Bories G, Brantom P, Brufau de BarberaJ CA, Cocconcelli P, Debski B. Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. EFSA J. 2008;7)32(:1-15.

6. Mojgani N, Torshizi MA, Rahimi S. Screening of locally isolated lactic acid bacteria for use as probiotics in poultry in Iran. J.Poult.Sci. 2007;44(4):357-65.

7. Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing Lactobacillus acidophilus L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. JACN. 1999;18(1):43-50.

8. Al-Saleh A, Metwalli A, Abu-Tarboush H. Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and Bifidobacteria. J. Saudi Soc. for Food and Nutrition. 2006;1(1):1-17.

9. Başyiğit G, Kuleaşan H, Karahan AG. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. J.Ind Microbiol Biotechnol. 2006;33(9):796-800.

10. Bacha K, Mehari T, Ashenafi M. In-vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from 'Wakalim', a traditional Ethiopian fermented beef sausage. Ethiop J Health Sci. 2009;19(1):21-9.

11. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. Int J Food Microbiol. 2001;67(3):207-16.

12. Hechard Y, Dherbomez M, Cenatiempo Y, Letellier F. Antagonism of lactic acid bacteria from goats' milk against pathogenic strains assessed by the 'sandwich method'. Letters in applied microbiology. 1990;11(4):185-8.

13. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res Microbiol. 2006;157(3):241-7.

14. Todorov S, Dicks L. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. EMT. 2005;36(2):318-26.

15. Liong M, Shah N. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. International Dairy Journal. 2005;15(4):391-8.

16. Lye H-S, Rahmat-Ali GR, Liong M-T. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal. 2010;20(3):169-75.

17. Mojgani N, Hussaini F, Vaseji N. Characterization of Indigenous Lactobacillus Strains for Probiotic Properties. Jundishapur J Microbiol. 2015;8(2): e17523.

18. Sahadeva R, Leong S, Chua K, Tan C, Chan H, Tong E, et al. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. International Food Research Journal. 2011;18(4):1515-22.

19. Minelli EB, Benini A, Marzotto M, Sbarbati A, Ruzzenente O, Ferrario R, et al. Assessment of novel

Archive of SID

www.SID.ir

probiotic Lactobacillus casei strains for the production of functional dairy foods. International Dairy Journal. 2004;14(8):723-36.

20. Cebeci A, Gürakan C. Properties of potential probiotic Lactobacillus plantarum strains. Food Microbiology. 2003;20(5):511-8.

21. Narimani T, Trained A, Hejaz M. Isolation and biochemical and molecular identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional cow milk and yogurt of Koi city.2015;12(48): A115-28

22. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, et al. Bile salt and acid tolerance of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS microbiology letters. 2005;244(1):129-37.

23. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. Am J Clin Nutr. 2001;73(2):399s-405s.

24. Amraii HN, Abtahi H, Jafari P, Mohajerani HR, Fakhroleslam MR, Akbari N. In Vitro Study of Potentially Probiotic lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Traditional Dairy Products. Jundishapur J Microbiol. 2014;7(6): e10168.

25. Mandal S, Puniya A, Singh K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. International Dairy Journal. 2006;16(10):1190-5.

26. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins J. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. JAM. 1998;84(5):759-68.

27. Piranfar SH, K Keramanshahi R, Fouladi G. Characteristics of probiotic Lactobacillus strains isolated systems, namely, silage corn and rice bran and cover them with alginate and chitosan polymers to increase stability. JRMS. 1387;35(6):223-232.

28. Tsai C-C, Lin P-P, Hsieh Y-M, Zhang Z-y, Wu H-C, Huang C-C. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. The Scientific World Journal. 2014.

29. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of biotechnology. 2000;84(3):197-215.

30. Ogunbanwo S, Sanni A, Onilude A. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OG1. AJB. 2003;2(8):219-27.

31. Boris S, Jiménez Díaz R, Caso J, Barbes C. Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. J Appl Mirobiol. 2001;91(2):328-33.

Archive of SID

www.SID.ir