Archive of SID



10.30495/JFH.2019.669329 «مقاله پژوهشی»

# ویژگی‌های پروبیوتیکی و فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از لوله گوارش مرغ‌های بومی جنوب‌غرب و شمال‌غرب ایران

مریم رویان[1*]، مریم هاشمی[2]، رامین صیقلانی[3]، حسین علائی کرد قشلاقی[4]

۱. استادیار منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
۲. دانشیار، بخش تحقیقات میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳. کارشناس ارشد منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
٤. کارشناس منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات:m.royan@abrii.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۸/۵/٦ پذیرش نهایی:۹۸/۹/٤)

## چکیده

پروبیوتیک‌ها به‌عنوان استراتژی کنترل زیستی پاتوژن‌های گوارشی مشترک منقله از غذا در ارتقاء امنیت غذایی مصرف کننده مورد توجه هستند. هدف از این پژوهش بررسی خصوصیات پروبیوتیکی و توانایی مهار پاتوژن‌های گوارشی منتقله از غذا توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی جداسازی شده از مجرای گوارش مرغ‌های بومی بود. در این مطالعه توانایی تحمل اسید و صفرا در ۲۱٦ جدایه اسید لاکتیکی بررسی گردید و ۱۳ جدایه برتر به‌منظور توالی‌یابی ژن 16 S rRNA انتخاب شدند. سپس توانایی مهار پاتوژن‌های گوارشی مشترک بین انسان و طیور توسط جدایه‌های انتخابی بررسی گردید. بررسی ژن 16S rRNA در این مطالعه مشخص نمود که تمامی جدایه‌های متعلق به جنس‌های لاکتوباسیلوس بودند. از سیزده جدایه جدا شده، ۷ جدایه متعلق به گونه *لاکتوباسیلوس روتری* (*Lactobacillus reuteri*)، ۳ جدایه *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* (*Lactobacillus crispatus*) و ۳ جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواروس* (*Lactobacillus salivarius*) بودند. تمام جدایه‌ها قادر به تحمل pH=۳ به‌مدت ۳ ساعت و توانایی تحمل ۰/۳ درصد صفرا بودند. از میان جدایه‌های مورد بررسی، ۳ جدایه متعلق به گونه *L. salivarius* و یک جدایه متعلق به گونه *L. reuteri* از توانایی بهتری جهت مهار پاتوژن‌های گوارشی مشترک بین انسان و طیور برخوردار بودند. این مطالعه مشخص نمود که پتانسیل پروبیوتیکی مناسب در شماری از جدایه‌های لاکتوباسیل جداسازی شده از روده مرغان بومی ایران در شرایط برون تنی (*in vitro*)، آن‌ها را تبدیل به کاندیدهای مناسبی در ترکیب مکمل‌های پروبیوتیکی جهت ارتقاء امنیت غذایی مصرف کننده پس از انجام آزمایش‌ها درون تنی (*in ovo*) می‌نماید.

**واژه‌های کلیدی:** پروبیوتیک، پاتوژن‌های گوارشی، توالی‌یابی 16 S rRNA، لاکتوباسیلوس، مرغ بومی ایران



www.SID.ir

Archive of SID



**مقدمه**

بیماری‌های منتقله از غذا با تحمیل ضرر اقتصادی و جانی فراوان یکی از دلایل عمده نگرانی در حوزه امنیت غذایی مصرف کننده در کشورهای درحال توسعه می‌باشد. بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، سالانه حدود شش‌صد میلیون نفر با پاتوژن‌های منتقله از غذا آلوده شده و حدود چهارصد و بیست هزار نفر از سراسر جهان در اثر این آلودگی محکوم به مرگ هستند. *سالمونلا*، *اشریشیا کولای*، *استافیلوکوکوس ائورئوس* و *کمپیلوباکتر ژوژنی* از جمله مهم‌ترین پاتوژن‌های گوارشی مشترک بین انسان و ماکیان می‌باشند (Herve DT and Bintsis, 2017; Kumar G, 2017). استراتژی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی با توانایی مهار پاتوژن‌های گوارشی مشترک بین انسان و ماکیان در جیره جوجه‌های گوشتی در کاهش شیوع بیماری‌های گوارشی منتقله از گوشت مرغ در مصرف کننده موفق عمل نموده است (Park *et al.*, 2016). از این‌رو منفعت استفاده از مکمل پروبیوتیکی در جیره حیوانات مزرعه می‌تواند منفعتی دوسویه برای تولید کننده و مصرف‌کننده باشد زیرا استفاده از مکمل‌های پروبیوتیکی مناسب علاوه بر بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی می‌تواند منجر به کاهش قابل‌توجه شیوع پاتوژن‌های گوارشی مشترک منتقله از غذا در جامعه انسانی گردد (Park *et al.*, 2016). در حال حاضر از طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در ترکیب مکمل پروبیوتیکی جوجه‌های گوشتی استفاده‌شده است که در میان باکتری‌های پروبیوتیکی استفاده‌شده در ترکیب آن‌ها، باکتری‌های اسید لاکتیکی خصوصاً *لاکتوباسیلوس*‌ها از ساکنان معمول مجرای گوارش محسوب می‌شوند و بر سایر گونه‌های پروبیوتیکی ارجحیت داشته و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند (Vizoso-Pinto *et al.*, 2006; Saarela *et al.*, 2000). به‌عنوان مثال استقرار سویه‌های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوسی* در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی اثر ممانعت کننده بر روی استقرار سالمونلا در روده جوجه‌های گوشتی داشته و متعاقب استفاده از آن بار آلودگی گوشت مرغ با این میکروب کاهش می‌یابد (Van Coillie *et al.*, 2007). هم‌چنین *باکتریوسین* مشتق شده از لاکتوباسیلوس سالیواریوس اثر ضد میکروبی مؤثری بر روی کمپیلوباکتر ژوژنی داشته (Pilasombut *et al.*, 2006) و یا مکمل پروبیوتیکی حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* منجر به کاهش استقرار *کمپیلوباکتر ژوژنی* در روده جوجه‌ها گوشتی می‌گردد (Morishita *et al.*, 1997). امروزه مکمل‌های پروبیوتیکی مختلف به‌منظور استفاده در صنعت طیور، به‌صورت تجاری عرضه شده است اما یافتن باکتری‌های مفیدی که بتواند علاوه بر بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی منجر به کاهش آلودگی دستگاه گوارش و متعاقب آن گوشت طیور از پاتوژن‌های مشترک منتقله از غذا *نظیر سالمونلا*، *ایشریشا کلی* و *استافیلوکوکوس ائورئوس* گردد از جمله اهدافی است که می‌تواند علاوه بر سودآوری برای تولید کننده منجر به تولید گوشت با امنیت غذایی بالاتری برای مصرف کننده گردد. یک میکروارگانیسم مفید برای آنکه قادر به کاهش بار آلودگی گوشت طیور از پاتوژن‌های گوارشی منتقله از غذا باشد، ابتدا باید قادر به بقاء در شرایط اسیدی معده بوده و قدرت تحمل اسیدهای صفراوی قسمت‌های آغازین روده کوچک را



www.SID.ir

Archive of SID



داشته باشد (Erkkilä and Petäjä, 2000) تا بتواند در روده پرنده مستقر شده و پس از آن رشد پاتوژن‌های گوارشی منتقله از غذا در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی را مهار نماید. *لاکتوباسیلوس*ها از ساکنان معمول مجرای گوارش موجودات محسوب می‌شوند و بر سایر گونه‌های پروبیوتیکی به‌منظور استفاده در ترکیب مکمل پروبیوتیکی ارجحیت داشته و شماری از گونه‌های *لاکتوباسیلوسی* سازمان غذا و داروی آمریکا و سازمان امنیت غذایی اروپا به‌عنوان ارگانیسم‌های بی‌خطر شناخته شده‌اند (Rubio *et al.*, 2014). *لاکتوباسیلوس*ها با تغییر pH روده با تولید ترکیباتی نظیر اسیدهای آلی و تولید ترکیباتی نظیر باکتریوسین‌ها منجر به نامساعد شدن شرایط برای رشد پاتوژن‌ها در مجرای گوارش میزبان می‌گردند (Callaway and Ricke, 2012).

لذا هدف از انجام این مطالعه جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلی از دستگاه گوارش مرغ‌های بومی و سالم استان خوزستان (شهرستان‌های کارون، شوش و اندیمشک) و استان آذربایجان غربی (شهرستان‌های ارومیه و اشنویه) و بررسی توانایی بقاء باکتری‌های جداسازی شده در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی و سپس بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های انتخابی علیه پاتوژن‌های منتقله از غذا شامل *سالمونلا تیفی‌مویوم* (*Salmonella typhimurium*)، *سالمونلا اینتیریتیدیس* (*Salmonella typhimurium*)، *اشریشیا کولای* (*Escherichia coli*) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (*aureus Staphylococcus*) در شرایط برون‌تنی به‌منظور معرفی جدایه‌های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوسی* با توانایی کاهش بار میکروبی گوشت طیور از پاتوژن‌های گوارشی مشترک بین انسان و طیور می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های باکتریایی اسید لاکتیکی**

به‌منظور انجام این مطالعه نمونه‌برداری از محتویات مجرای گوارش سه مرغ بومی از استان خوزستان (شهرستان‌های کارون، شوش و اندیمشک) و ۵ مرغ بومی نیز از استان آذربایجان غربی (شهرستان‌های ارومیه و اشنویه) انجام گرفت. تمام مرغ‌های بومی مورد نمونه‌برداری از سلامت کامل برخوردار بوده و سنی در حدود یک سال داشتند و در شرایط آزاد و بدون مصرف آنتی‌بیوتیک بر اساس اظهار پرورش دهندگان روستایی نگهداری می‌شدند. در این مطالعه محتویات بخش‌های چهارگانه (دئودنوم، ژئوژنوم، ایلئوم و سکوم) مجرای گوارش در شرایط کاملاً استریل و پس از ذبح با یکدیگر مخلوط گردیده و به نسبت یک به ده (w/v) در محلول PBS استریل رقیق گردید. پس از آن رقت‌های سریالی از رقت اولیه تا رقت $10^{7}$ درPBS استریل نرمال تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت مناسب بر روی پلت‌های آگاردار (Man Rogosa and Sharpe, MRS-merk) منتقل شد و تحت شرایط بی‌هوازی ( CO2 incubator; Binder) در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از سپری شدن مدت‌زمان انکوباسیون، کلنی‌ها به‌صورت تصادفی بر اساس شکل از سطح پلیت‌های MRS آگاردار برداشته شده و به‌منظور خالص‌سازی بیشتر بر روی



www.SID.ir

Archive of SID



پلیت‌های MRS آگار جدید کشت گردیدند. جدایه‌های جداسازی شده به‌صورت مقدماتی توسط تست کاتالاز، تست رنگ‌آمیزی گرم وKOH (۳ درصد) بررسی شدند. محیط کشت آبگوشتی حاوی جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی با اسکیم میلک ۱۰ درصد و گلیسرول ۶۰ درصد به نسبت ۱/۱ مخلوط شده و در فریزر ۸۰- به‌منظور بررسی‌های بعدی ذخیره گردیدند (Royan *et al.*, 2018).

**- تست اولیه سریع به‌منظور بررسی مقاومت به شرایط اسیدی مجرای گوارش**

غربالگری سریع اولیه جدایه‌های باکتریایی به‌منظور تحمل به اسید تک‌تک جدایه‌های اسید لاکتیکی گرم مثبت و کاتالاز منفی انجام گرفت. جدایه‌های باکتریایی به‌مدت یک شب در MRS مایع و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت شدند، سپس یک درصد (v/v) از این کشت شبانه پس از سانتریفوژ به محلول PBS در ۳= pH تلقیح شده و به‌مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از آن میزان زنده‌مانی جدایه‌های باکتریایی با انتقال ۱۰۰ میکرولیتر از این کشت اولیه بر روی محیط کشت MRS جامد منتقل شد و میزان زنده‌مانی با بررسی تراکم کلنی‌های رشد یافته پس از ۴۸ ساعت بررسی گردید (Ehrmann *et al.*, 2002).

**- بررسی میزان زنده‌مانی در حضور نمک‌های صفراوی**

به‌منظور بررسی میزان تحمل صفرا، یک درصد (v/v) از کشت شبانه هر یک از جدایه‌های لاکتوباسیلوسی با غلظت ۷ تا ۸ log CFU/mL که قادر به گذر از تست اولیه سریع اسید شدند، به محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۳ درصد صفرای گوساله (Sigma-Aldrich, USA) و یا بدون آن (به‌عنوان شاهد) اضافه شدند و به‌مدت ۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند (Yamazaki *et al.*, 2012). میزان جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر (Vernazza *et al.*, 2006) در پلت‌های ۹۶ خانه‌ای و در دستگاه اسپکتروفتومتر (BIOTECK ELx 808, *USA*) قبل و بعد از ۸ ساعت ثبت شده و با کنترل مقایسه شد. سویه های لاکتوباسیلوسی که میزان رشدی بیش از ۵۰ درصد در صفرا ۰/۳ درصد نسبت به کنترل نشان دادند به‌عنوان جدایه‌های مقاوم به صفرا در نظر گرفته شدند (Kumar and Kumar, 2015).

میزان تحمل صفرا توسط فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مقاومت} = \frac{\text{افزایش OD در MRS مایع با نمک صفراوی}}{\text{افزایش OD در MRS مایع بدون نمک صفراوی}}$$

**- استخراج DNA و تکثیر ژن 16S rRNA**

DNA از پلت‌های باکتریایی حاصل از کشت شبانه (۱/۵ میلی‌لیتر) هر یک از جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت MRS مایع پس از سانتریفوژ در ۵۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از کیت استخراج DNA از باکتری گرم مثبت (Sinagene, Iran) استخراج گردید. قطعه ۱/۵ kb ژن 16S rRNA، با استفاده از پرایمرهای یونیورسال F27 و R1492 تکثیر شد (Lane, ;



www.SID.ir

Archive of SID



McDonald *et al.*, 1995 1991). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در مخلوط‌های ۲۵ µl در دستگاه ترموسایکلر PCR (ASTEC, Japan) انجام شد. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بود از: واسرشته‌سازی اولیه در ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ٤ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل واسرشته سازی در ۹٤ درجه سلسیوس و هر سیکل به‌مدت یک دقیقه، اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، مرحله گسترش پرایمر ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و یک مرحله نهایی گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه. پس از خالص‌سازی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از متد سانگر با استفاده از دستگاه سکوئینسینگ 3730XL (ABI, USA) تعیین توالی شد. سکانس‌ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit version 7 ویرایش شدند. توالی ژن 16S rRNA باکتری موردنظر با توالی 16S rRNA باکتری‌های مشابه با استفاده از ابزار BLAST در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند (Shokryazdan *et al.*, 2014). از برنامه CLUSTAL W نرم‌افزار Bioedit version 7 برای alignment سکانس‌ها استفاده گردید. درنهایت درخت فیلوژنی بر اساس سکانس‌های 16S rRNA با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و روش Neighbor-Joining ترسیم شد.

**- بررسی میزان زنده‌مانی در pH اسیدی**

سنجش‌های نهایی به‌منظور تعیین میزان تحمل اسید جدایه‌های دارای توانایی تحمل صفرا ۰/۳ درصد با استفاده از متد توصیه شده (Yamazaki *et al.*, 2012) با مقداری تغییر انجام شد. به‌طور خلاصه ۳۳۳ میکرولیتر از کشت شبانه هر یک از جدایه‌های باکتریایی دارای توانایی تحمل ۰/۳ درصد صفرا به ۳ میلی‌لیتر از محیط MRS مایع اضافه شده (pH نهایی بر روی ۳ تنظیم گردید) و به‌مدت ۳ ساعت در دمی ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند. پس از سپری شدن این زمان میزان زنده‌مانی با کشت ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های سریالی ۱۰ برابر مناسب، قبل و بعد از سه ساعت انکوباسیون بر روی محیط کشت آگاردار مناسب انجام شده و پس از آن شمارش کلنی‌های باکتریایی انجام شد (Yamazaki *et al.*, 2012).

**- توانایی مهار پاتوژن‌های گوارشی منتقله از غذا**

توانایی مهار پاتوژن‌های مشترک منتقله از غذا نظیر *سالمونلا اینتریتیدیس* (ATCC 13076)، *سالمونلا تیفیموریوم* (ATCC 14028)، *اشریشیا کولای* (O157) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) با استفاده از روش نقطه‌گذاری بر روی پلیت آگاردار انجام گردید (Tour´e *et al.*, 2003). به‌طور خلاصه ۲ میکرولیتر از محیط کشت حاوی جدایه باکتریایی به‌منظور کشت نقطه‌ای بر روی پلت MRS agar منتقل گردید، پلیت‌ها پس از خشک شدن در دمای اتاق، در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت، پس از مشاهده رشد و توسعه کلنی‌ها سطح پلت با ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت آگاردار نرم (w/v) ۰/۷ درصد حاوی ۱ درصد (v/v) از کشت فعال سویه‌های پاتوژن پوشانده شد. سپس پلت‌ها در دما و در شرایط ایده‌آل پاتوژن‌های مذکور (شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت) گرمخانه‌گذاری شدند. پس از مدت‌زمان مذکور قطر هاله عدم رشد اطراف کلنی‌ها اندازه‌گیری شد و وجود هاله عدم رشد، با قطر بیش از



www.SID.ir

Archive of SID



۲ میلی‌متر به‌عنوان اثر ضدمیکروبی علیه میکروارگانیسم گزارش شد (Tour´e *et al.*, 2003).

**- آنالیز آماری**

داده‌های هر آزمایش از طریق تجزیه واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹-۲ (۲۰۰۸) آنالیز آماری گردیدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و سطح ۰/۰۵ به‌عنوان معیار معنی‌دار بودن تفاوت‌ها لحاظ گردید.

## یافته‌ها

در این مطالعه ابتدا ۲۱۶ جدایه اسید لاکتیکی گرم مثبت و کاتالاز منفی از مخلوط محتویات قسمت‌های چهارگانه (دئودنوم، ژئوژنوم، ایلئوم و سکوم) روده‌ی ۸ مرغ بومی متعلق به نواحی روستایی اشنویه، ارومیه، کارون، اندیمشک و شوش جداسازی گردیدند که از میان آن‌ها ۱۳ جدایه واجد پتانسیل پروبیوتیکی می‌باشند نمودار (۲)، جدول (۲و۳).

**- نتایج شناسایی و آنالیز فیلوژنی جدایه‌ها با استفاده از ژن** 16S rRNA

نتایج مقایسه ژن 16S rRNA جدایه‌ها در جدول (۱) نشان داد که هر ۱۳ جدایه متعلق به جنس لاکتوباسیلوس می‌باشند. از میان ۱۳ جدایه به‌ترتیب ۳، ۷ و ۳ جدایه بیش از ۹۹ درصد شباهت با *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* را نشان دادند. نتایج توالی‌یابی ۱۳ جدایه جداسازی شده در NCBI GenBank با شماره‌های دسترسی MG547723 تا MG547735 برای جدایه‌های ABRIIN27 تا ABRIIN39 ذخیره گردیده است.

جدول (۱)- مشخصات ۱۳ جدایه باکتریایی اسید لاکتیکی با استفاده از توالی ژن 16S rRNA

| جدایه لاکتوباسیلوس | شماره دسترسی | نزدیک‌ترین گونه در بانک ژن | درصد مشابهت |
|---|---|---|---|
| ABRIIN27 | MG547723 | *L. salivarius* | ۹۹ |
| ABRIIN28 | MG547724 | *L. reuteri* | ۹۹ |
| ABRIIN29 | MG547725 | *L. reuteri* | ۹۹ |
| ABRIIN30 | MG547726 | *L. reuteri* | ۹۹ |
| ABRIIN31 | MG547727 | *L. reuteri* | ۹۹ |
| ABRIIN32 | MG547728 | *L.crispatus* | ۹۹ |
| ABRIIN33 | MG547729 | *L. salivarius* | ۹۹ |
| ABRIIN34 | MG547730 | *L.crispatus* | ۱۰۰ |
| ABRIIN35 | MG547731 | *L. reuteri* | ۹۹ |
| ABRIIN36 | MG547732 | *L. reuteri* | ۹۹ |
| ABRIIN37 | MG547733 | *L.crispatus* | ۹۹ |
| ABRIIN38 | MG547734 | *L. reuteri* | ۱۰۰ |
| ABRIIN39 | MG547735 | *L. salivarius* | ۹۹ |

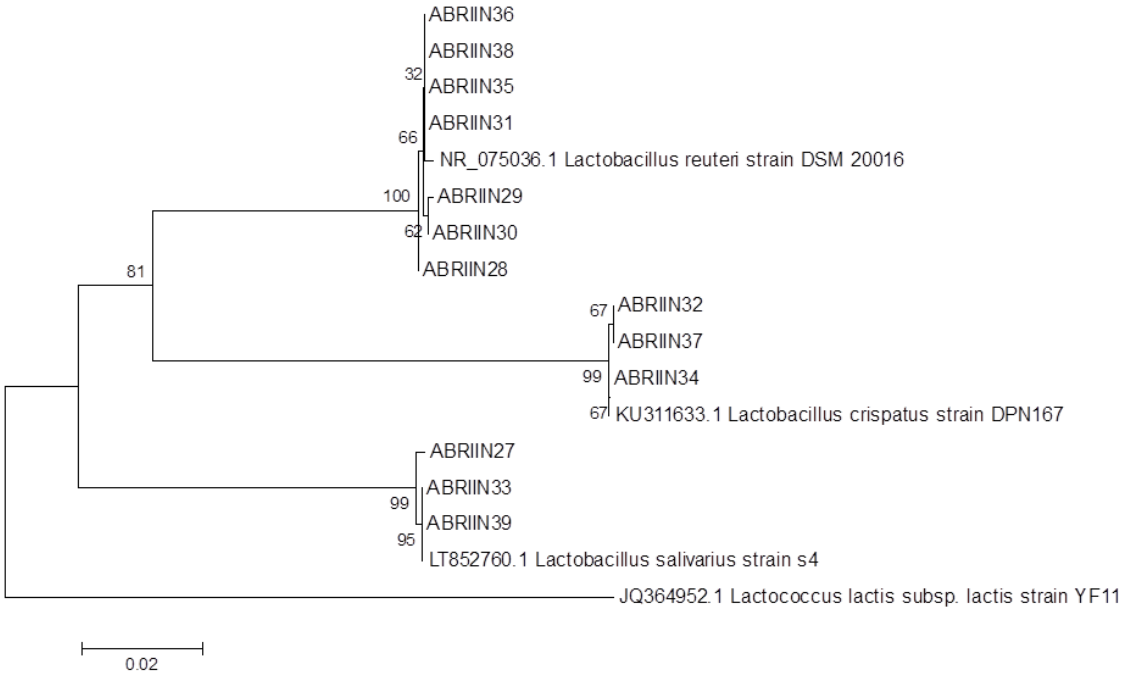


www.SID.ir

Archive of SID



درخت فیلوژنتیک شکل (۱) بر اساس توالی‌های ژن 16S rRNA جدایه‌های پژوهش حاضر و توالی‌های 16S rRNA، ٤ گونه لاکتوباسیلوسی به‌دست‌آمده از بانک ژنی ترسیم گردید. در این مطالعه از *لاکتوکوکوس لاکتیس* JQ364952.1 به‌عنوان Outgroup استفاده شد. جدایه‌های مشابه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*، *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* و *لاکتوباسیلوس روتری* در سه گروه اصلی مجزا قرار گرفتند. جدایه‌های ABRIIN28، ABRIIN29، ABRIIN30، ABRIIN31، ABRIIN35، ABRIIN36 و ABRIIN38 با *لاکتوباسیلوس روتری* DSM 20016 در یک گروه اصلی قرار گرفتند. اما این گروه خود به دو زیر گروه تقسیم گردید که زیر گروه اول عبارت بود از ABRIIN29، ABRIIN30، ABRIIN31، ABRIIN35، ABRIIN36 و ABRIIN38 و زیر گروه دوم تنها دربرگیرنده ABRIIN28 بود. گروه اصلی دوم سه جدایه ABRIIN32، ABRIIN37 و ABRIIN34 را در برمی‌گیرد که با یکدیگر تشکیل خوشه داده و با *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* DPN167 در یک گروه قرار گرفتند. جدایه‌های ABRIIN27، ABRIIN33 و ABRIIN39 با *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* S4 LT852760.1 تشکیل یک گروه را دادند.




شکل (۱)- درخت فیلوژنی بر اساس متد neighbor-joining و توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA.

**- توانایی تحمل صفرا توسط جدایه‌های لاکتوباسیلوسی جداسازی شده از مجرای گوارش مرغان بومی**

در این مطالعه مشخص گردید که سیزده جدایه مورد بررسی قادر به تحمل ۰/۳ درصد صفرای گاوی بودند، اما در میان آن‌ها میزان رشد ۱۲ جدایه لاکتوباسیل جداسازی شده در حضور ۰/۳ درصد صفرای گاوی نسبت به گروه شاهد (بدون صفرا) دارای کاهش است. هر سیزده جدایه در این مطالعه قادر به بقاء در محیط

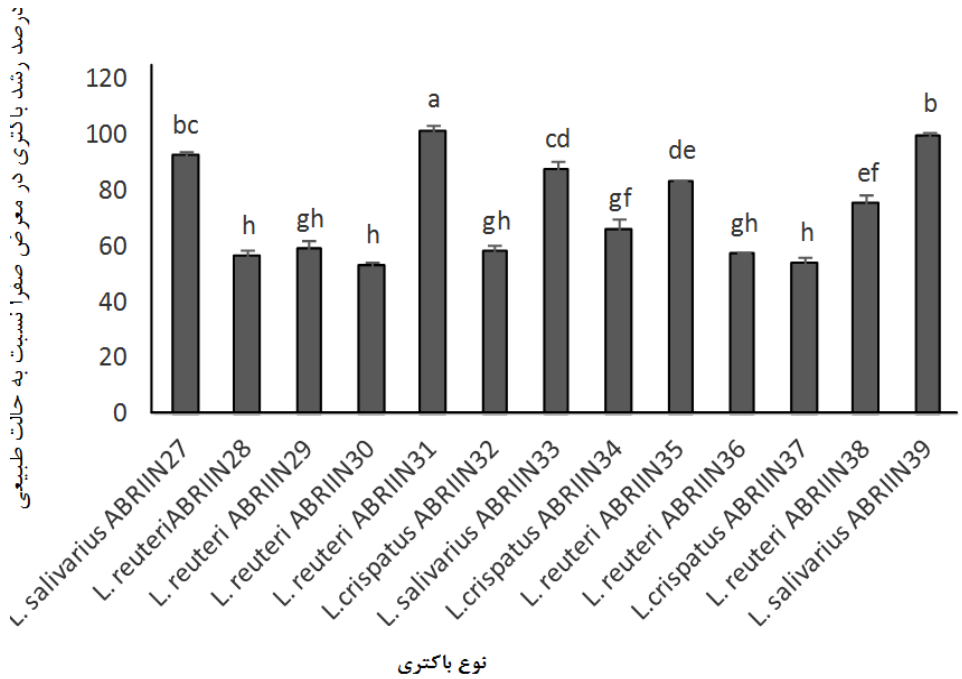


www.SID.ir

Archive of SID



حاوی ۰/۳ درصد صفرای گاوی به‌میزان بیش از ۵۰ درصد گردیدند. بالاترین مقاومت در برابر صفرا ۰/۳ درصد متعلق به جدایه *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN31 (۲/۲۹ ± ۱۰۱/۵۲ درصد) بود که تفاوت معنی‌داری با سایر جدایه‌ها داشته و رشدی معادل گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵). پس از آن، بالاترین مقاومت نسبت به صفرا نمودار (۱) به‌ترتیب متعلق به جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN39 (۱/۲۲± درصد ۹۹/۹۶)، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27 (۱/۵۳ ± درصد۹۲/۳۷)، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN33 (۳/۲۸ ± درصد ۸۷/۵۵)، *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN35 (۰/۰۹± درصد۸۳/۲۰) و *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN38 (۲/۹٤± درصد ۷۵/۱۸) بود (p<۰/۰۵).




نمودار (۱)- توانایی تحمل صفرا ۰/۳ درصد توسط *جدایه‌های لاکتوباسیلوس*؛ [a-h] حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت است (p< ۰/۰۵).

**- بررسی توانایی تحمل اسید جدایه‌های لاکتوباسیلوسی جداسازی شده از دستگاه گوارش مرغان بومی**

توانایی بقاء ۱۳ جدایه لاکتوباسیلوسی مورد مطالعه در این پژوهش نسبت به شرایط اسیدی pH =۳ و به‌مدت سه ساعت در جدول (۲) نشان داده شده است. توانایی زنده‌مانی در شرایط اسیدی با بررسی میزان کاهش در زنده‌مانی سلول‌های باکتریایی ( log CFU/mL) بعد از ۳ ساعت گرمخانه‌گذاری ارزیابی گردید. در این مطالعه میزان کاهش در بقاء سلولی ( log CFU/mL) پس از ۳ ساعت قرار گرفتن در pH برابر ۳، کمتر از یک واحد و بین ۰/۰۲- (کمترین مقدار برای *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* ABRIIN37) تا ۰/۸۲ (بیشترین مقدار برای *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN39)، ثبت گردید. تنها جدایه *لاکتوباسیلوس*



www.SID.ir

Archive of SID



*سالیواریوس* ABRIIN39 ازنظر توانایی تحمل اسید دارای تفاوت آماری معنی‌داری با سایر جدایه‌ها به‌استثناء جدایه‌های *لاکتوباسیلوس روتری* *ABRIIN36* و *لاکتوباسیلوس روتری* *ABRIIN38* ($p<۰/۰۵$) بود و بین سایر جدایه‌ها از این نظر تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

**- بررسی اثر ضد میکروبی جدایه‌های لاکتوباسیلوسی جداسازی شده از مجرای گوارش مرغان بومی**

در این مطالعه اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده جدول (۳) بر روی باکتری‌های پاتوژن *سالمونلا انتریتیدیس* (ATCC13076)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC 14028)، *اشریشیا کولای* (O157) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) با استفاده از روش نقطه‌گذاری بر روی پلیت آگار (Tour´e *et al.*, 2003) ارزیابی گردید. دوازده جدایه از میان سیزده جدایه قادر به مهار رشد چهار پاتوژن مورد مطالعه بودند و تنها جدایه *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN35 قادر به مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* نگردید. قطر هاله‌های عدم رشد در سویه‌های مختلف متغییر بود. در مطالعه حاضر جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*ABRIIN33، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN39، *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN30 و *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN31 از بالاترین توانایی مهار *سالمونلا انتریتیدیس* برخوردار بودند. جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27 و *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN31 ازنظر مهار رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* دارای بالاترین توانایی بودند. بالاترین توانایی مهار *E. coli* (O157) در مطالعه حاضر توسط جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27 و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN33 مشاهده گردید. جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN33 و *لاکتوباسیلوس روتری*ABRIIN28 بالاترین توانایی مهار *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) را نشان دادند. در این مطالعه *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN35 و *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN38 به‌ترتیب قادر به مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* O157 نگردیدند. *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27 بالاترین توانایی را در مهار هر چهار پاتوژن مورد مطالعه نشان داد که میزان آن به‌ترتیب ۱۲/۶۶±۰/۶۶، ۹/۳۳±۰/۳٤، ۱۱/۲۵±۰/٤۷ و ۷/۳۳±۰/۸۸ میلی‌متر برای مهار *سالمونلا انتریتیدیس* (ATCC13076)، (*سالمونلا تیفیموریوم* ATCC 14028)، *اشریشیا کولای* O157 و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923) بود.



www.SID.ir

Archive of SID



جدول (۲) – توانایی بقاء جدایه‌های لاکتوباسیلوس (log CFU/mL) قبل و بعد از سه ساعت قرار گرفتن در معرض pH =۳

| جدایه‌های لاکتوباسیلوس | زنده‌مانی سلولی 1(log CFU/mL) | | کاهش زنده‌مانی سلولی (واحد لگاریتمی) |
|---|---|---|---|
| | پیش از قرارگیری در pH=3 | پس از قرارگیری در pH=3 | |
| *L. salivarius ABRIIN27* | ۸/۹۸±۰/۰۳ | ۸/۶۹±۰/۰۰ | ۰/۲۹$^{bcde}$ |
| *L. reuteriABRIIN28* | ۸/۲۹±۰/۰۰ | ۸/۰۷±۰/۰۱ | ۰/۲۲$^{cde}$ |
| *L. reuteri ABRIIN29* | ۸/۵٤±۰/۰۲ | ۸/۲۱±۰/۱٤ | ۰/۳۳$^{bcd}$ |
| *L. reuteri ABRIIN30* | ۸/۸۷±۰/۰۳ | ۸/۷۷±۰/۰٦ | ۰/۰۹$^{de}$ |
| *L. reuteri ABRIIN31* | ۸/۳۵±۰/۰۵ | ۸/۲۲±۰/۰۵ | ۰/۱۲$^{de}$ |
| *L.crispatus ABRIIN32* | ۸/۳۷±۰/۰۲ | ۸/۳۲±۰/۰۳ | ۰/۰٤$^{de}$ |
| *L. salivarius ABRIIN33* | ۹/۱۰±۰/۰۵ | ۸/۷٦±۰/۰۱ | ۰/۳۳$^{bcd}$ |
| *L.crispatus ABRIIN34* | ۸/۳۵±۰/۰۲ | ۸/۰۳±۰/۰۲ | ۰/۳۲$^{bcd}$ |
| *L. reuteri ABRIIN35* | ۸/۷۲±۰/۰۵ | ۸/۳۹±۰/۰٤ | ۰/۳۳$^{bcd}$ |
| *L. reuteri ABRIIN36* | ۸/۵۵±۰/۰۰ | ۷/۹٦±۰/۰٦ | ۰/۵۹$^{ab}$ |
| *L.crispatus ABRIIN37* | ۸/۵٤±۰/۰٦ | ۸/۵۷±۰/۰٦ | –۰/۰۲$^{e}$ |
| *L. reuteri ABRIIN38* | ۸/۵٤±۰/۰٤ | ۸/۰۱±۰/۰۲ | ۰/۳$^{abc}$ |
| *L. salivarius ABRIIN39* | ۸/۰٦±۰/۰٤ | ۷/۲٤±۰/۲۷ | ۰/۸۲$^{a}$ |

مقادیر میانگین±خطای استاندارد دو آزمایش مستقل هریک با سه تکرار هستند.

$^{a-e}$ حروف غیرمشابه نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت است ($p$<۰/۰۵).

جدول (۳)– میانگین قطر (میلی‌متر) هاله عدم رشد در ارزیابی خاصیت ضد میکروبی جدایه‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

| جدایه‌های لاکتوباسیلوسی | *S.enteritidies* (ATCC 13076) | *S.typhimurium* (ATCC 14028) | *E. coli* (O157) | *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) | اسیدیته عصاره عاری از سلول | اسیدیته عصاره عاری از سلول |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *L. salivarius* ABRIIN27 | ۱۲/٦٦±۰/٦٦$^{a}$ | ۹/۳۳±۰/۳٤$^{ab}$ | ۱۱/۲۵±۰/٤۷$^{a}$ | ۷/۳۳±۰/۸۸$^{a}$ | ۳/۹۲ | ۳/۹۲ |
| *L. reuteri* ABRIIN28 | ٤/۰۰±۰/۵۷$^{ed}$ | ۵/۰۰±۰/۵۷$^{c}$ | ۲/۵۰±۰/٦٤$^{de}$ | ۷/٦۷±۰/۳۰$^{a}$ | ٤/۲۹ | ٤/۲۹ |
| *L. reuteri* ABRIIN29 | ٤/٦٦±۰/۸۸$^{ed}$ | ۳/٦٦±۰/۸۸$^{cde}$ | ۳/۰۰±۰/۵۷$^{de}$ | ۱/۰۰±۰/۰۰$^{cd}$ | ٤/۲۸ | ٤/۲۸ |
| *L. reuteri* ABRIIN30 | ۸/٦٦±۰/۸۰$^{b}$ | ۳/۰۰±۰/۵۸$^{cdef}$ | ٤/۰۰±۰/٤۰$^{cd}$ | ۱/٦۷±۰/۳٤$^{bcd}$ | ٤/۲۹ | ٤/۲۹ |
| *L. reuteri* ABRIIN31 | ۸/۰۰±۰/۰۰$^{b}$ | ۱۰/۳۳±۰/۸۰$^{a}$ | ۵/٦۰±۰/۳۰$^{bc}$ | ۳/۳۳±۰/۳۳$^{b}$ | ٤/۳۷ | ٤/۳۷ |
| *L.crispatus* ABRIIN32 | ۱/۰۰±۰/۰۰$^{f}$ | ۱/۳۳±۰/۳۳$^{f}$ | ۳/۰۰±۰/٤۰$^{de}$ | ۲/۳٤±۰/۳۳$^{bc}$ | ۳/۹۲ | ۳/۹۲ |
| *L. salivarius* ABRIIN33 | ۸/۰۰±۱/۰۰$^{b}$ | ۷/٦٦±۰/٦٦$^{b}$ | ۱۰/۰۰±۰/۵۷$^{a}$ | ٦/۳۳±۰/۸۸$^{a}$ | ۳/۹۱ | ۳/۹۱ |
| *L.crispatus* ABRIIN34 | ۳/۳۳±۰/۳۳$^{edf}$ | ۲/٦٦±۰/۳۳$^{efd}$ | ۲/۵۰±۲/٦٤$^{de}$ | ۲/۳۳±۰/۳٤$^{bc}$ | ۳/۹٤ | ۳/۹٤ |
| *L. reuteri* ABRIIN35 | ۵/۰۰±۱/۱۵$^{cd}$ | ٤/۰۰±۰/۵۷$^{cd}$ | ۵/۷۵±۰/٤۷$^{bc}$ | - | ٤/۳۹ | ٤/۳۹ |
| *L. reuteri* ABRIIN36 | ۳/٦٦±۰/٦٦$^{edf}$ | ۱/٦٦±۰/۳۳$^{ef}$ | ۲/۲۵±۰/٤۷$^{de}$ | ۱/٦۷±۰/۳۳$^{bcd}$ | ٤/٤۲ | ٤/٤۲ |
| *L.crispatus* ABRIIN37 | ۳/۰۰±۰/۵۷$^{edf}$ | ۲/٦٦±۰/۳۳$^{efd}$ | ۱/۵۰±۲/۲۸$^{ef}$ | ۱/۳٤±۰/۳٤$^{cd}$ | ۳/۹۲ | ۳/۹۲ |
| *L. reuteri* ABRIIN38 | ۲/۰۰±۰/۵۷$^{ef}$ | ۲/۳۳±۲/٦٦$^{efd}$ | - | ۱/۳۳±۰/۳۳$^{cd}$ | ٤/٤۲ | ٤/٤۲ |
| *L. salivarius* ABRIIN39 | ۷/٦٦±۰/٦٦$^{bc}$ | ۷/٦٦±۰/۳۳$^{b}$ | ٦/۵۰±۰/٦٤$^{b}$ | ۳/۳۳±۰/۳۳$^{b}$ | ۳/۹۳ | ۳/۹۳ |

مقادیر میانگین ± خطای استاندارد سه تکرار هستند.

$^{a-f}$ در هر ستون حروف غیرمشابه نشان دهنده معنی‌دار بودن تفاوت در سطح احتمال ۰/۰۵است ($p$<۰/۰۵).



www.SID.ir

Archive of SID



## بحث و نتیجه‌گیری

امروزه به‌دلیل رهایی از معضل رو به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و مصرف ایمن گوشت مرغ جداسازی و بررسی جنبه‌های مختلف توانمندی باکتری‌های پروبیوتیکی به‌منظور استفاده از آن‌ها در ترکیب مکمل‌های پروبیوتیکی اختصاصی جوجه‌های گوشتی امری اجتناب‌ناپذیر است (Blajman *et al.*, 2014). اگر سویه‌های باکتریایی پروبیوتیکی مورد استفاده در ترکیب مکمل پروبیوتیکی طیور قادر به مهار پاتوژن‌های گوارشی مشترک منتقله از غذا باشد، در صورت استفاده از آن بار آلودگی دستگاه گوارش پرنده نسبت به پاتوژن‌های مزبور کاهش چشمگیری نشان داده و در صورت آلوده شدن گوشت مرغ در کشتارگاه با محتویات گوارشی خطر انتقال پاتوژن‌های مذکور از طریق مصرف گوشت در مصرف کننده کاهش می‌یابد. سویه‌های باکتریایی پروبیوتیکی معمولاً در آب یا خوراک طیور استفاده می‌شوند و برای اینکه قادر به ایفاء نقش سلامتی بخش خود در قسمت‌های پائین دستگاه گوارش پرنده باشند، باید قابلیت بقاء در قسمت‌های مختلف مجرای گوارش پرنده را داشته باشند تا به‌سلامت به منطقه هدف برسند. در مطالعات دیگر نیز همانند تحقیق حاضر، ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* از دستگاه گوارش مرغ بومی منطقه اصفهان جداسازی شدند (Aazami *et al.*, 2014) و جداسازی *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* با پتانسیل پروبیوتیکی از فضولات طیور نیز گزارش شده است (Asghar *et al.*, 2016). *لاکتوباسیلوس روتری* از جمله جنس‌های *لاکتوباسیلوسی* غالب و عمده‌ی مجرای گوارش انسان و جانوران است (Casas and Dobrogosz, 2000). *لاکتوباسیلوس روتری*، باکتری بومی حقیقی روده بزرگ میزبان است که وظیفه تنظیم و ثبات فیزیولوژیک روده بزرگ میزبان را بر عهده دارد (Dobrogosz and Reuter, 2001; Lindgren, 1995).

توانایی بقاء و زنده‌مانی مناسب در شرایط اسیدی پیش معده و سنگدان اولین و مهم‌ترین چالش پیش روی باکتری پروبیوتیکی مصرف شده توسط ماکیان است. پس از چالش اسید وجود نمک‌های صفراوی موجود در روده کوچک، دومین چالش پیش روی باکتری کاندید پروبیوتیکی بوده و باکتریایی باید قادر به بقاء در این شرایط نامساعد باشد (Yamazaki *et al.*, 2012). انتظار بر این است که تحمل اسید و صفرا در شرایط برون تنی، شاخصی از توانایی بقاء باکتری در شرایط ویژه و نامساعد دستگاه گوارش باشد (Rubio *et al.*, 2014). در مطالعه حاضر سیزده جدایه انتخاب شده بعد از ۳ ساعت قرار گرفتن در معرض pH=۳، کاهش زنده‌مانی به میزان کمتر از یک واحد لگاریتمی را نشان دادند که این امر نشان می‌دهد درصد قابل قبولی از جدایه‌های لاکتوباسیلوسی جداسازی شده قادر به عبور از شرایط اسیدی پیش معده و سنگدان می‌باشند. در گزارشی مشخص گردید که از میان ۲۰ جدایه لاکتوباسیلوسی جدا شده از مدفوع نوزاد، تنها درصد زنده‌مانی سه جدایه *لاکتوباسیل پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی* (*L. paracasei* subsp. Paracasei) و یک جدایه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*L. rhamnosus*) بعد از ۲ ساعت تحمل pH=۳ بدون تغییر ماند (Xanthopoulos *et al.*, 2000). در تحقیقی دیگر گزارش شد که *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس*



www.SID.ir

Archive of SID



*سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس انیمالیس* (*L. animalis*) قادر به تحمل pH=۳ به‌مدت ٤ ساعت بودند (Ehrmann *et al.*, 2002). اگرچه امکان کاهش pH معده به کمتر از ۳ وجود دارد، اما اغلب مطالعات به بررسی توانایی تحمل pH=۳ پرداخته‌اند (Garriga *et al.*, 1998; Xanthopoulos *et al.*, 2000). محتمل است غذا یا دیگر ملکول‌های حامل منجر به پدید آوردن حالت بافری برای سویه‌های پروبیوتیک گردیده و سویه‌های پروبیوتیکی در معرض شرایط اسیدی واقعی موجود در معده قرار نمی‌گیرند (Prasad *et al.*, 1998).

هفت جدایه در میان جدایه‌های جداسازی شده در مطالعه حاضر متعلق به گونه *لاکتوباسیلوس روتری* می‌باشد، مطالعات انجام شده طی دو دهه گذشته نشان داده‌اند که *لاکتوباسیلوس روتری* پس از مصرف قادر به بقاء در شرایط اسیدی و حاوی صفرا قسمت‌های بالای مجرای گوارش و چسبیدن به موکوس اپیتلیوم و استقرار در دستگاه گوارش میزبان می‌باشد (Valeur *et al.*, 2004; Vernazza *et al.*, 2006). در روده‌ی طیور، غلظت نمک‌های صفراوی در دئودنوم بالاترین مقدار (۰/۱۷۵ درصد) و در سکوم پائین‌ترین مقدار (۰/۰۰۸ درصد) است (Lin *et al.*, 2003). سطح مورد استفاده صفرا در این مطالعه مشابه بسیاری از مطالعات جداسازی جدایه‌های پروبیوتیکی و بیشتر از غلظت صفرا موجود در مجرای گوارش پرندگان بود (Kizerwetter-Świda, M. and Binek, M. 2016; Kim *et al.*, 2014) گزارش شده است که صفرا با غلظت ۰/۳ درصد یک غلظت حیاتی جهت ارزیابی توانایی تحمل صفرا توسط باکتری‌های پروبیوتیکی اسید لاکتیکی است (Sahadeva *et al.*, 2011).

نتایج تحمل صفرا در مطالعه حاضر نمودار (۱) نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه دارای حداقل توانایی تحمل صفرا و رسیدن به ۵۰ درصد نرخ رشد خود بودند. توانایی تحمل صفرا در جدایه‌های انتخاب شده در این مطالعه دارای تنوع بود و در میان جدایه‌ها سه جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جداسازی شده دارای توانایی تحمل صفرا بالاتر و رسیدن به بیش از ۸۰ درصد نرخ رشد خود بوده و یک جدایه *لاکتوباسیلوس روتری* (ABRIIN31) در محیط کشت حاوی صفرا رشدی معادل محیط کشت نرمال داشت. در توافق با مشاهدات این مطالعه، گزارش‌های محققان دیگر نشان داد که توانایی تحمل صفرا توسط جدایه‌های لاکتوباسیلوسی قابلیتی مختص به سویه باکتریایی می‌باشد و از سویه‌ای به سویه دیگر متغیر است، به‌طوری‌که گزارش گردیده است توانایی تحمل صفرا در جدایه‌ها ارتباطی با محیطی که جدایه باکتریایی از آن محیط جدا شده نداشته و خصوصیتی مختص سویه می‌باشد (Shokryazdan *et al.*, 2014). هم‌چنین مشاهده شده است که جدایه‌های باکتریایی اسید لاکتیکی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (*Streptococcus thermophilus*)، *لاکتوباسیلوس کازئی شیروتا* (*L. casei Shirota*)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیفیدوباکتریوم* جداشده از نوشیدنی شیر از نظر توانایی تحمل صفرا از پروفایلی مختص سویه برخوردار هستند (Sahadeva *et al.*, 2011).

در این مطالعه میزان مهار رشد چهار پاتوژن مورد مطالعه توسط لاکتوباسیلوس‌های مورد مطالعه با یکدیگر



www.SID.ir

Archive of SID



متفاوت بود. اما در میان باکتری‌های مورد مطالعه جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بهترین مهار رشد را از خود نشان دادند. نتیجه این مطالعه همانند مطالعه انجام شده پیشین نشان داد که جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جدا شده از مجرای گوارش مرغ تخم‌گذار دارای بهترین میزان مهار رشد *S. Enteritidis* و *S. Typhimurium* می‌باشند (Yamazaki *et al.*, 2012). هم‌چنین گزارش گردیده است که جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جدا شده از سکوم و مدفوع خوک قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌های پاتوژن به‌ویژه سالمونلا می‌باشند (Casey *et al.*, 2004). آن‌ها این امر را به توانایی کاهش pH ناشی از تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی عنوان نمودند. نتایج مطالعه حاضر جدول (۳) نیز بیانگر pH اسیدی‌تر محیط کشت باکتریایی عاری از سلول سه جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* نسبت به سایر جدایه‌ها می‌باشد.

نتیجه این مطالعه مشخص نمود که جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیکی با پتانسیل پربیوتیکی مناسب مانند جدایه‌های *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* از دستگاه گوارش مرغان بومی ایران با توانایی مهار پاتوژن‌های گوارشی منتقله از گوشت طیور به انسان میسر می‌باشد. درنتیجه این مطالعه پیشنهاد می‌گردد که می‌توان از این جدایه‌های اسیدلاکتیکی دارای پتانسیل پروبیوتیکی به‌ویژه جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN39، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* ABRIIN27 و *لاکتوباسیلوس روتری* ABRIIN31 در طراحی مکمل‌های پروبیوتیکی اختصاصی طیور گوشتی پس از انجام مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی بیشتر استفاده نمود.

## سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به دلیل تأمین هزینه اجرای این پژوهش قدردانی می‌گردد.

## تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.



www.SID.ir

Archive of SID



## منابع


- Asghar, S., Arif, M., Nawaz, M., Muhammad, K., Ali, M.A., Ahmad, M.D. *et al.*, (2016). Selection, characterisation and evaluation of potential probiotic Lactobacillus spp. isolated from poultry droppings. Beneficial Microbes. 7(1): 35-44.
- Aazami, N., Salehi Jouzani, G., Khodaei, Z., Meimandipour, A., Safari, M. and Goudarzvand, M. (2014). Characterization of some potentially probiotic Lactobacillus strains isolated from Iranian native chickens. Journal of General and Applied Microbiology. 60(6):215-521.
- Blajman, J.E., Frizzo, L.S., Zbrun, M.V., Astesana, D.M., Fusari, M.L., Soto, L.P. *et al.* (2014). Probiotics and broiler growth performance: a meta-analysis of randomised controlled trials. British Poultry Science. 55(4):483-94.
- Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. AIMS Microbiol. 3(3): 529–563.
- Callaway, T.R. and Ricke, S.C. (2012) Direct-fed microbials and prebiotics for animals: science and mechanisms of action. New York: Springer.
- Casas, I.A. and Dobrogosz, W.J. (2000). Validation of probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. Microbial Ecology in Healt and Disease. 12(4): 247–285.
- Casey, P.G., Casey, G.D., Gardiner, G.E., Tangney, M., Stanton, C., Ross, R.P. *et al.* (2004). Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. Letters in Applied Microbiology. 39(5):431-8.
- De Vuyst, L., Falony, G. and Leroy, F. (2008). Probiotics in fermented sausages. Meat Science. 80(1): 75-78.
- Dobrogosz, W.J. and Lindgren, S.E. (1995). Method for determining the presence of an antibiotic produced by Lactobacillus reuteri. Biotechnology Advances. 13(4): 741.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. and Vogel, R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. Journal of Applied Microbiology. 92(5): 966-975.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science. 55(3): 297-300.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. Journal of Applied Microbiology, 84(1): 125-32.
- Herve DT, Kumar G. (2017). Prevalence of *Staphylococcus aureus* in retail chicken meat samples in Jalandhar, Punjab. Research Journal of Pharmacy and Technology. 10(1): 1-5.
- Kim, J.I., Janay Young, A., Nereus, W., Gunther, I.V. and Jung-Lim, L. (2014). Inhibition of Salmonella by bacteriocin-producing lactic acid bacteria derived from U.S. kimchi and broiler chicken. Journal of Food Safety. 35(1): 1-12.
- Kizerwetter-Świda, M. and Binek, M. (2016). Assessment of potentially probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from chickens. Polish Journal of Veterinary Sciences, 19(1):15-20
- Kumar, A. and Kumar, D. (2015). Characterization of Lactobacillus isolated from dairy samples for probiotic properties. Anaerobe. 33: 117-123.
- Lane, D.J. (1991).16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds. Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. John Wiley and Sons: New York, 115-175.
- Lin, J., Sahin, O., Michel, L.O. and Zhang, Q. (2003) Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. Infection and Immunity. 71(8): 4250-4259.
- McDonald, I.R., Kenna, E.M. and Murrell, J.C. (1995). Detection of methanotrophic bacteria in environmental samples with the PCR. Applied and Environmental Microbiology. 61(1): 116–121.




www.SID.ir

Archive of SID




- Park Y. H., Hamidon F., Rajangan C., Soh K. P., Gan C. Y., Lim T. S., *et al.* (2016). Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. Korean Journal of Food Science and Animal Resources, 36 567–576.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. and Gopal, P.K. (1998). Selection and characterization of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. International Dairy Journal. 8(12): 993-1002.
- Reuter, G. (2001). The Lactobacillus and Bifidobacterium Microflora of the human intestine. Composition and succession. Current Issues in Intestinal Microbiology. 2(2): 43-53.
- Royan, M., Alaie Kordghashlaghi, H., Afraz, F., Hashemi, M., Vahidi, S.M.F. and Seighalani, R. (2018). Screening Lactobacilli Isolates from Northern Iran Backyard Chickens as Bio-control Strategy against Salmonella Enteritidis and Salmonella Typhimurium. KafKas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergis. 24(3): 423-430.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T. and Garriga, M. (2014). Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. Food Microbiology. 38: 303-311.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm. (2000). T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology, 84(3): 197-215.
- Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, G.H., Chan, H.Y., Tong, E.V. *et al.* (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. International Food Research Journal. 18(4): 1515-1522.
- Sanders, M.E. (2008) Probiotics: definition, sources, selection and uses. Clinical Infectious Diseases, 46(2): 58- 61.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alitheen, N.B., Faseleh Jahromi, M. *et al.* (2014). Probiotic Potential of Lactobacillus Strains with Antimicrobial Activity against Some Human Pathogenic Strains. BioMed Research International. 2014:1–16
- Tour´e, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. and Fliss, I. (2003). Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against Listeria monocytogenes. Journal of Applied Microbiology. 95(5):1058-1069.
- Vizoso-Pinto, M.G., Franz, C., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. (2006). Lactobacillus spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. International Journal of Food Microbiology. 109(3): 205-214.
- Valeur, N., Engel, P., Carbajal, P., Connolly, E. and Ladefoged, E. (2004). Colonization and immunomodulation by Lactobacillus reuteri ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. Applied and Environmental Microbiology. 70(2): 1176-81.
- Vernazza, L., Gibson, G.R. and Rastall, R.A. (2006).Carbohydrate Preference, Acid Tolerance and Bile Tolerance in Five Strains of Bifidobacterium. Journal of Applied Microbiology, 100(4):846-53.
- Wolf, B.W., Garleb, K.A., Ataya, D.G. and Casas, I.A. (1995). Safety and tolerance of Lactobacillus reuteri in healthy adult subjects. Microbial Ecology Healt and Disease. 8(2):41-50.
- Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Tzanetakis, N. (2000). Characterization of Lactobacillus isolates from infant faeces as dietary adjuncts. Food Microbiology. 17(2): 205-215.
- Yamazaki, M., Ohtsu, H., Yakabe, Y., Kishima, M. and Abe, H. (2012). In vitro screening of lactobacilli isolated from chicken excreta to control Salmonella Enteritidis and Typhimurium. British Poultry Science. 53(2): 183-189.




www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 35 Autumn 2019

"Research article" 10.30495/JFH.2019.669329

# The probiotic and antagonistic properties of isolated lactobacilli from the intestine of free-range chickens from southwest and northwest of Iran

**Royan, M.[1*], Hashemi, M.[2], Seighalani R.[3], Alaie Kordghashlaghi, H.[4]**

1. Assistant Professor, North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
2. Associate Professor, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. M.Sc, North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
4. M.Sc. Technical Support in Genomics Department, North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

*Corresponding Author: m.royan@abrii.ac.ir

(Received: 2019/7/28 Accepted: 2019/11/25)

## Abstract

Probiotics as a replacement for growth promoter antibiotics and foodborne pathogens bio-control strategy are attractive in the broiler chicken industry and improve consumer food safety. This research was designed to investigate the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from the digestive tract of local domestic chickens in Iran. In this study, the persistence of 216 lactic acid bacteria isolates was investigated to acid and bile and 13 superior isolates were selected to be identified using the 16S rRNA gene sequencing. Afterward, the ability of 13 selected lactobacilli isolates to control foodborne pathogens was studied. The results of the 16S rRNA gene sequencing showed that all isolates belonged to the Lactobacillus species. Of the 13 isolates, 7, 3 and 3 isolates belonged to *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus salivarius*, respectively. All of these isolates were able to tolerate pH= 3 for 3 hours and 0.3% bile salts. Three isolates belonging to *L. salivarius* were more effective to inhibit common Zoonotic bacteria. This study revealed that the *in vitro* favorable probiotic potential in some isolated lactobacilli from the native chicken digestive tract from Iran, introduce them as good candidates in probiotic supplements to improve food safety of consumer after conducting *in vivo* tests.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Intestinal pathogens, Iranian Native chicken, Lactobacilli, Probiotic, 16 S rRNA sequencing



www.SID.ir