# ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و تنوع درون گونه‌ای سویه‌های *Lactobacillus plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف با روش RAPD-PCR

**دینا شهرام‌پور[1*]، مرتضی خمیری[2]، محبوبه کشیری[2]، سید محمد علی رضوی[3]**

۱. دانش آموخته دکتری، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

***نویسنده مسئول:** *shahrampour@gau.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۱

## چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع درون گونه‌ای ۱۰ سویه *Lactobacillus plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف شامل زیتون تخمیری، پنیرکوزه، شیر شتر و خمیر ترش به کمک روش RAPD-PCR و همچنین مقایسه قابلیت پروبیوتیکی آن‌ها بود. نتایج نشان داد که الگوی باندی متفاوتی توسط سه نوع پرایمر برای سویه‌های مختلف به وجود آمد و برطبق ماتریس تشابه رسم شده توسط نرم‌افزار NTSYS بر اساس ضریب جاکارد، به طورکلی ۱۰ سویه در دو شاخه اصلی و ۷ زیرگروه جانبی قرار گرفتند. دو سویه KAO۱۷ و KAO۶۴ جدا شده از منشا یکسان زیتون تخمیری بیشترین شباهت را داشتند. علاوه بر این ویژگی پروبیوتیکی سویه‌های *L. plantarum* در سطح نژاد متفاوت ارزیابی شد. نتایج تست ایمنی نشان داد که همه نژادهای مختلف *L. plantarum*، گاما-همولتیک بودند و در برابر آنتی بیوتیک ونکومایسین مقاوم بودند و مقاومت آن‌ها در برابر سایر آنتی بیوتیک‌های رایج متفاوت بود. سویه‌های جدا شده از پنیر کوزه شامل KMC۳۷ و KMC۴۵ از بیشترین مقاومت در برابر اسید برخوردار بودند. از سوی دیگر مقاومت در برابر ۰/۳ درصد نمک صفراوی نشان داد که اختلاف معناداری از این نظر بین سویه‌های جدا شده از زیتون تخمیری وجود ندارد و سویه KMM ۵ بیشترین مقاومت را داشت. به علاوه فعالیت ضدمیکروبی سویه ها در برابر باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت *L. monocytogenes* و گرم منفی *E. coli* متفاوت بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی به سویه KMC۴۵ تعلق داشت. بنابراین با توجه به هدف مورد نظر می‌توان هریک از سویه‌های *L. plantarum* را به عنوان کشت پروبیوتیک در صنایع غذایی و دارویی پیشنهاد نمود.

**کلید واژه ها:** *L. plantarum*، RAPD-PCR، تنوع درون گونه‌ای، ویژگی‌های پروبیوتیک.

## مقدمه

لاکتوباسیلوس‌ها بزرگترین جنس در گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که بیش از ۱۵۰ گونه باکتریایی را در خود جای می‌دهند. لاکتوباسیلوس‌ها میکروارگانیسم‌هایی گرم مثبت، میکروآئروفیل، غیراسپورزا، میله‌ای کوتاه خمیده یا میله‌ای بلند و یا تخم مرغی شکل، معمولا غیرمتحرک، مقاوم به اسید و کاتالاز منفی هستند. این باکتری‌ها نیازهای تغذیه‌ای پیچیده‌ای دارند و از کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب، پپتیدها، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مشتقات اسید نوکلئیک به عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. دمای بهینه رشد آن‌ها در دامنه ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد است. همچنین pH بهینه رشد آن‌ها بین ۵/۶-۵/۲ متغیر است. لاکتوباسیلوس‌ها در محصولات لبنی، غلات، گوشت، آبجو، شراب، میوه‌ها، ترشی سبزیجات، ساورکرات، خمیرترش، آب، خاک و فاضلاب به فراوانی یافت می‌شوند، آن‌ها همچنین بخشی از فلور طبیعی دهان، روده و واژن انسان و بسیاری از حیوانات را تشکیل می‌دهند (Winslow et al., 1917). علاوه بر این فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی باکتری‌های اسید لاکتیک از جمله گونه‌های مختلف *Lactobacillus* به دلیل تولید ترکیبات ضدمیکروبی مختلفی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، کربن دی اکسید و باکتریوسین در مطالعات متعددی گزارش شده است و با

توجه به ویژگی ایمن بودن، عنوان نگهدارنده زیستی به این باکتری‌ها داده شده است (Hartmann et al., 2011؛ Blagojev et al., 2012؛ Garde et al., 2014). یکی از گونه‌های معروف لاکتوباسیلوس‌ها *Lactobacillus plantarum* است، که گونه‌ای چند کاربردی بوده و در مواد غذایی مختلف به فراوانی یافت می‌شود و به عنوان کشت آغازگر در فرایند تخمیر موثر می‌باشد (Di Cagno et al., 2010). کاربرد گسترده این گونه ممکن است که توانایی سازگاری اکولوژی آن با محیط‌های مختلف را نشان دهد. اندازه ژنوم *L. plantarum* WCFS1 (۳/۳ Mb) جدا شده از بزاق انسان، بزرگترین ژنومی است که تا به امروز در باکتری‌های اسید لاکتیک توالی‌یابی شده است (Kleerebezem et al., 2003). بزرگ بودن اندازه ژنوم احتمالا به قابلیت تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف کمک کرده و امکان زندگی در محیط‌های مختلف را برای این گـــونه فراهم می‌کند (Bringel et al., 2001). آنالیز نسبی ژنوم ۲۰ نژاد مختلف *L. plantarum* جدا شده از منابع متعدد با ترکیب بازی متفاوت، نشان دهنده تکامل آن‌ها بوده است. با وجود بسیاری از مطالعات اکولوژیک انجام گرفته در مورد تایپینگ مولکولی *L. plantarum*، علاقه به این موضوع به ویژه برای درک سازگاری تکاملی این گونه به موقعیت‌های زیست محیطی مختلف، هنوز هم بسیار زیاد است. علاوه بر این، ارزیابی تمایز درون گونه‌ای گام اولیه مهمی برای انتخاب کشت‌های آغازگر است. زیرا ویژگی-های تکنولوژیکی، پروبیوتیکی و ضدمیکروبی عمدتا به نژاد میکروارگانیسم وابسته است (Di Cagno et al., 2010). یکی از ویژگی‌های مطلوب گونه *L. plantarum* قابلیت پروبیوتیک آن می‌باشد که در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است. در سال ۲۰۰۲، فائو و سازمان بهداشت جهانی یک تعریف واحد برای پروبیوتیک‌ها ارائه کردند که در آن پروبیوتیک‌ها را میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری‌زایی معرفی نمودند، که در صورت مصرف مداوم و کافی ($10^6$cfu/gr or ml)، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند(FAO/WHO, 2002).

بررسی ویژگی مقاومت در برابر شرایط گوارشی و فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های لاکتیکی حاصل از موادغذایی تخمیری مختلف شامل زیتون تخمیری (احمدی و همکاران، ۱۳۹۵)، کیمچی (Lee et al., 2016)، هوره (Vasiee et al., 2018)، شیرشتر و پنیرکوزه (محمودی و همکاران، ۱۳۹۷) که جزء مهم‌ترین معیارهای انتخاب باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند، نشان داد که نژادهای مختلف *L. plantarum* نسبت به سایر جدایه‌های لاکتیکی از بیشترین قابلیت پروبیوتیکی برخوردار بودند. نخستین ضرورت برای توسعه یک محصول غذایی پروبیوتیک انتخاب سویه پروبیوتیک مناسب می‌باشد. زنده‌مانی در طول فرایند تولید و انبارمانی، زنده‌مانی طی عبور از دستگاه گوارش، ایمن بودن و پتانسیل ایجاد اثرات سلامتی‌بخش بر فرد مصرف کننده از جمله معیارهای اصلی انتخاب سویه‌های پروبیوتیک است (Tambekar and Bhutada, 2010). بسیاری از گونه‌های باکتریایی پروبیوتیک با قابلیت تکنولوژیکی مطلوب به جنس لاکتوباسیلوس اختصاص دارد زیرا مقاومت بیشتری نسبت به بیفیدوباکترها دارند (Mättö et al, 2006 ؛ Lee and salminen, 2009). براساس تحقیقات انجام شده بقای باکتری‌ها در برابر عوامل مضر در طی فراوری و تولید محصول به نوع گونه و نژاد وابسته است (Tamime et al., 2005). هدف از این پژوهش بررسی تنوع نژادی سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف به روش RAPD-PCR و مقایسه ویژگی‌های پروبیوتیک آن‌ها است.

## روش کار

فعال‌سازی باکتری‌ها

۱۰ سویه *Lactobacillus plantarum* که قبلا شناسایی مولکولی آنها براساس ناحیه 16srRNA انجام گرفته و توالی آنها در NCBI تایید شده بود، از بانک

میکروبی گروه صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. ابتدا کشت ذخیره هریک از باکتری‌ها پس از خروج از فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS مایع تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه-گذاری گردید. پس از ایجاد کدورت در محیط کشت، عمل فوق یکبار دیگر تکرار گردید تا از فعال شدن باکتری‌ها در محیط مایع اطمینان حاصل شود. در مرحله بعد، ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از کشت‌های مایع باکتریایی بر روی محیط کشت MRS آگار کشت خطی داده شد و مجدد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار گرفت. پس از ظاهر شدن پرگنه‌ها در سطح محیط کشت، به منظور تایید خلوص و عدم آلودگی کشت باکتریایی آزمون‌های رنگ آمیزی گرم و کاتالاز بر روی آن‌ها انجام گرفت (Lee et al., 2016).

جدول ۱- سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از مواد غذایی مختلف و نژادهای مشابه در پایگاه NCBI[1]

| کد سویه | منشاء | شماره دسترسی نژاد مشابه در پایگاه NCBI | نام نژاد مشابه در پایگاه NCBI | درصد تشابه |
|---|---|---|---|---|
| KAO ۱۷ | زیتون تخمیری | KX 261527.1 | *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum strain W2* | ۹۷ |
| KAO ۸۰ | زیتون تخمیری | KR 055065.1 | *Lactobacillus plantarum strain CSCWL 7-3* | ۹۸ |
| KAO ۲۱ | زیتون تخمیری | LT 593850.1 | *Lactobacillus plantarum partial 16S rRNA gene* | ۹۷ |
| KAO ۴۱ | زیتون تخمیری | KM 513642.1 | *Lactobacillus plantarum strain CSI 7* | ۹۷ |
| KAO ۶۴ | زیتون تخمیری | NR 112690.1 | *Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891* | ۹۷ |
| KMC ۴۵ | پنیر کوزه | KM 495883.1 | *Lactobacillus plantarum strain gp 57* | ۹۸ |
| KMC ۶۱ | پنیر کوزه | KM 495875.1 | *Lactobacillus plantarum strain gp 46* | ۹۷ |
| KMC ۳۷ | پنیر کوزه | EU 419598.1 | *Lactobacillus plantarum strain KLDS 610.1* | ۹۷ |
| KMM ۵ | شیر شتر | KM 495894.1 | *Lactobacillus plantarum strain gp106* | ۹۷ |
| KES ۱۰ | خمیر ترش | NR 104573.1 | *Lactobacillus plantarum strain CIP 103151* | ۹۸ |

جدول ۲- پرایمرهای مورد استفاده در آزمون RAPD-PCR (دی کانگو و همکاران، ۲۰۱۰)

| پرایمر | توالی | درصد **CG** | دمای ذوب **(°C)** |
|---|---|---|---|
| M13 | GAGGGTGGCGGTTCT | ۶۶/۶ | ۵۱/۶ |
| P7 | AGCAGCGTCG | ۷۰ | ۳۴ |
| P4 | CCGCAGCGTT | ۷۰ | ۳۴ |

1. National Center for Biotechnology Information

جدول ۳- شرایط دمایی برای واکنش RAPD-PCR مربوط به پرایمرهای این پژوهش

| پرایمر | مرحله | نام مرحله | مدت زمان | دما (°C) | تعداد تکرار هر مرحله |
|---|---|---|---|---|---|
| M13 | اول | واسرشتی اولیه | ۲ دقیقه | ۹۴ | ۱ |
| | | واسرشتی | ۱ دقیقه | ۹۴ | |
| | دوم | اتصال | ۴۵ ثانیه | ۴۲ | ۳۵ |
| | | طویل شدن | ۲ دقیقه | ۷۲ | |
| | سوم | طویل شدن نهایی | ۵ دقیقه | ۷۲ | ۱ |
| P4 و P7 | اول | واسرشتی اولیه | ۴ دقیقه | ۹۴ | ۱ |
| | | واسرشتی | ۱ دقیقه | ۹۴ | |
| | دوم | اتصال | ۱ دقیقه | ۳۰ | ۳۰ |
| | | طویل شدن | ۲ دقیقه | ۷۲ | |
| | سوم | طویل شدن نهایی | ۵ دقیقه | ۷۲ | ۱ |

بررسی تنوع نژادی سویه‌های *L. plantarum* به کمک تکنیک[۲] RAPD-PCR

استخراج DNA از نژادهای مختلف *L. plantarum*

استخراج DNA از هریک از باکتری‌ها به کمک کیت تجاری دنا زیست آسیا (ایران)، براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

RAPD-PCR

واکنش‌های RAPD-PCR برای هر سویه *L. plantarum* به کمک سه پرایمر M13، P7 وP4 (جدول ۲) در سه واکنش مجزا به صورت زیر در ترموسایکلر انجام گرفت.

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس قرمز، ۲ میکرولیتر پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول، ۶ میکرولیتر آب دیونیزه مولکولی و ۲ میکرولیتر از DNA الگو انجام گرفت. در هر سری واکنش نیز از آب مقطر دیونیزه مولکولی به جای DNA الگو به عنوان کنترل منفی استفاده شد. پس از اختلاط اجزای واکنش در میکروتیوپ ۰/۲ میلی‌لیتری تکثیر تصادفی قطعات DNA توسط هر پرایمر با توجه به برنامه دمایی مندرج در جدول ۳ صورت گرفت. لازم به ذکر است که در این آزمون از یک سویه کلکسیونی *Lactobacillus plantarum* (PTCC 1745) با جنس و گونه تایید شده به عنوان مرجع استفاده شد. بررسی اولیه محصولات RAPD-PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در ولتاژ ۱۰۰ ولت و زمان ۲ ساعت انجام شد و باندهای تشکیل شده در زیر نور UV در دستگاه ژل داک مورد مشاهده قرار گرفتند. سپس براساس الگوی باندی تشکیل شده (حضور یا غیاب باند) ماتریس دو گانه صفر یا یک برای هر سویه در مورد هر پرایمر ایجاد شد. در نهایت دندوگرام سویه‌های مورد آزمون با ادغام سه سری پروفایل RAPD-PCR توسط نرم‌افزار NTSYS (نسخه ۲/۲) ترسیم شد (Di Cagno et al., 2010).

بررسی ویژگی‌های پروبیوتیک نژادهای مختلف *L. plantarum*

ارزیابی فعالیت همولتیک

به منظور ارزیابی ایمنی نژادهای مختلف *L. plantarum*، فعالیت همولیتیک آن‌ها پس از کشت خطی بر روی محیط کشت آگار خون دار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و گرمخانه گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت همولتیک سویه‌ها براساس تشکیل هاله شفاف، هاله نسبتا سبز و یا عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی‌ها به ترتیب به

2. Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction

عنوان بتا-همولیزین، آلفا-همولیزین و گاما-همولیزین مشخص گردید. در این آزمون از باکتری‌های ( PTCC 1399 *Escherichia coli*) و (PTCC 1431) *Staphylococcus aureus* به عنوان کنترل مثبت به ترتیب برای آلفا-همولیزین و بتا-همولیزین استفاده شد (Taheur et al., 2016).

ارزیابی مقاومت در برابرآنتی‌بیوتیک‌های رایج

مقاومت نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر ۱۰ آنتی‌بیوتیک رایج شامل پنی‌سیلین، جنتامایسین، ونکومایسین، آمپی‌سیلین، استرپتومایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین و کلیندامایسین به روش انتشار از دیسک مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا ۵۰ میکرولیتر از کشت فعال یک شبه هریک از نژادهای مختلف *L. plantarum* در سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS آگار تلقیح و به کمک سوآپ استریل به صورت سطحی کشت داده شد. سپس دیسک-های آنتی‌بیوتیک در سطح محیط کشت قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت به گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. در پایان زمان مذکور قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در اطراف هر دیسک توسط خط‌کش اندازه-گیری و برحسب میلی‌متر گزارش گردید. سپس مقاومت نژادهای مختلف *L. plantarum* با توجه به قطر هاله عدم رشد تشکیل شده کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر به ترتیب به صورت مقاوم، حساس نسبی و حساس تعیین شد ( Turchi et al., 2013).

ارزیابی مقاومت به شرایط اسیدی

بدین منظور ابتدا کشت یک شبه هریک از نژادهای مختلف *L. plantarum* به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰g تحت سانتریفوژ قرار گرفت. سپس روماند دور ریخته شد و از رسوب باکتریایی حاصل پس از دوبار شستشو با محلول سرم فیزیولوژی استریل (۸/۵ گرم کلرید سدیم در یک لیتر آب مقطر) سوسپانسیونی با غلظت معادل نیم مک فارلند ( ۱۰$^{۸}$ cfu/ml) تهیه و به محیط کشت MRS مایع که pH آن توسط اسید کلریدریک ۵ نرمال معادل ۲ و ۳ تنظیم شده بود، اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شمارش باکتری‌های زنده در لحظه صفر و پس از ۳ ساعت به روش کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار انجام شد. مقاومت هریک از سویه‌های *L. plantarum* در برابر شرایط اسیدی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Lee et al., 2016).

نرخ بقا (٪) = $(N_1/ N_0) \times 100$

$N_1$= تعداد کل باکتری‌های زنده بعد از قرارگیری در شرایط اسیدی (log cfu/ml)، $N_0$= تعداد کل باکتری‌های زنده قبل از قرارگیری در شرایط اسیدی (log cfu/ml)

ارزیابی مقاومت به نمک صفراوی

به منظور ارزیابی مقاومت سویه‌های *L. plantarum* در برابر نمک صفراوی نیز، ابتدا کشت یک شبه هریک از آن-ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۴۰۰۰ تحت سانتریفوژ قرار گرفت. سپس روماند دور ریخته شد و از رسوب باکتریایی حاصل پس از دوبار شستشو با محلول سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیونی با غلظت معادل نیم مک فارلند ( ۱۰$^{۸}$cfu/ml) تهیه و به محیط کشت MRS مایع حاوی ۰/۳ درصد نمک صفراوی مشابه شرایط روده، تلقیح گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. شمارش باکتری‌های زنده در لحظه صفر و پس از ۴ ساعت به روش کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار انجام شد. مقاومت هریک از سویه‌های *L. plantarum* در مجاورت نمک صفراوی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Lee et al., 2016).

نرخ بقا (٪) = $(N_1/ N_0)\times 100$

$N_1$= تعداد کل باکتری‌های زنده بعد از قرارگیری در معرض نمک صفراوی (log cfu/ml)، $N_0$ = تعداد کل باکتری‌های زنده قبل از قرارگیری در معرض نمک صفراوی (log cfu/ml)

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی به روش میکرودایلوشن

به منظور تعیین حداقل غلظت بازداری (MIC)[3] و حداقل غلظت کشندگی (MBC)[4] روماند فاقد سلول هریک از سویه‌های *L. plantarum* از آزمون میکرودایلوشن استفاده شد. ابتدا ۱۸۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون مایع حاوی درصدهای مختلف از روماند فیلتر شده (۱۰۰-۱۰ درصد) به همراه ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا با غلظتی معادل cfu/ml $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$ به چاهک‌های موجود در میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد. کنترل مثبت شامل ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون مایع و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا و کنترل منفی تنها شامل محیط کشت مولر هینتون مایع حاوی درصدهای مختلف از روماند فیلتر شده بود. میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در پایان زمان مذکور میزان کدورت ایجاد شده در هر چاهک توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۳۰ نانومتر ارزیابی گردید. کمترین غلظت از روماند که به صورت ماکروسکوپی رشد باکتری و کدورتی در آن دیده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی در نظر گرفته شد. همچنین به منظور تعیین حداقل غلظت کشندگی از چاهک تعیین شده به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت‌های بالاتر آن میزان ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت MHA لکه‌گذاری گردید. کمترین غلظتی از روماند که هیچ‌گونه رشدی بر روی محیط کشت جامد مشاهده نگردید نیز به عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد(Taheur et al., 2016).

آنالیز آماری

در این پژوهش تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز و تجزیه تحلیل آماری داده‌ها از طریق طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ صورت گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد و نمودارها به کمک نرم افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۱۳ رسم شدند.

## نتایج

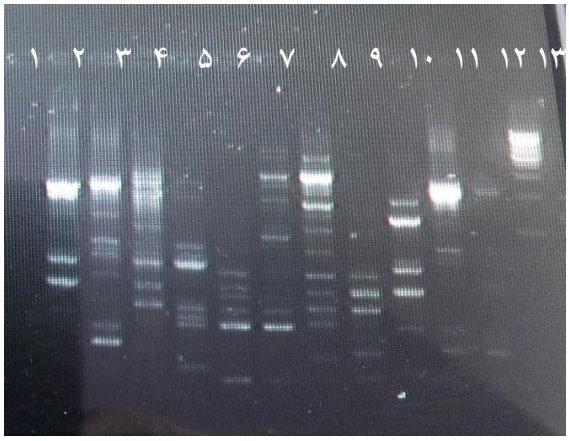
تنوع نژادی سویه های مختلف*L. plantarum*

تمامی سویه‌های *L. plantarum* مورد بررسی گرم مثبت و کاتالاز منفی تشخیص داده شدند. سپس به منظور بررسی تنوع درون گونه‌ای این سویه‌ها از سه آغازگر تصادفی M13، P7 و P4 در آزمون RAPD-PCR استفاده شد. الگوی باندی حاصل از همه آغازگرها باند-هایی در محدوده bp ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ ایجاد نمود. در مجموع این آغازگرها ۴۱ باند قابل کدگذاری ایجاد کردند که از این تعداد ۳۵ باند چند شکلی و ۶ باند اختصاصی بود. تعداد باندهای چند شکلی ایجاد شده توسط این سه آغازگر مساوی بود. همچنین همه آغازگرها باند اختصاصی تولید کردند و بیشترین باند اختصاصی ایجاد شده به آغازگر P7 اختصاص داشت. علاوه بر این آغازگرها هیچ باند مشترکی را در بین سویه‌های مورد مطالعه ایجاد نکردند (شکل ۱). از سویی دیگر تعداد باندهای اختصاصی، مشترک و چندشکلی ایجاد شده توسط آغازگرها در میان نژادهای مختلفی با منشاء یکسان مانند نژادهای مختلف حاصل از پنیرکوزه به ترتیب ۱۵ و ۵، ۲ و زیتون تخمیری به ۰، ۱۰ و ۲۲ باند بود. این ارقام نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالادر بین جدایه‌ها می‌باشد. در این پژوهش جهت بررسی تنوع ژنتیکی در بین جدایه‌ها و رسم دندروگرام از نرم‌افزار NTSYS (نسخه ۲/۰۲) استفاده شد. بدین منظور ابتدا ماتریس صفر و یک بر اساس مشاهده باند (۱) و یا عدم مشاهده باندها (۰) در تصاویر حاصل از الکتروفورز تهیه شد. سپس از ضرایب تطابق ساده، جاکارد و دایس و همچنین روش کلینک[5]، جفت گروه‌های نامتوازن[6] و اسلینک[7] به ترتیب برای به‌دست آوردن ضرایب تشابه ژنتیکی[8] و رسم دندروگرام استفاده شد. دندروگرام‌های

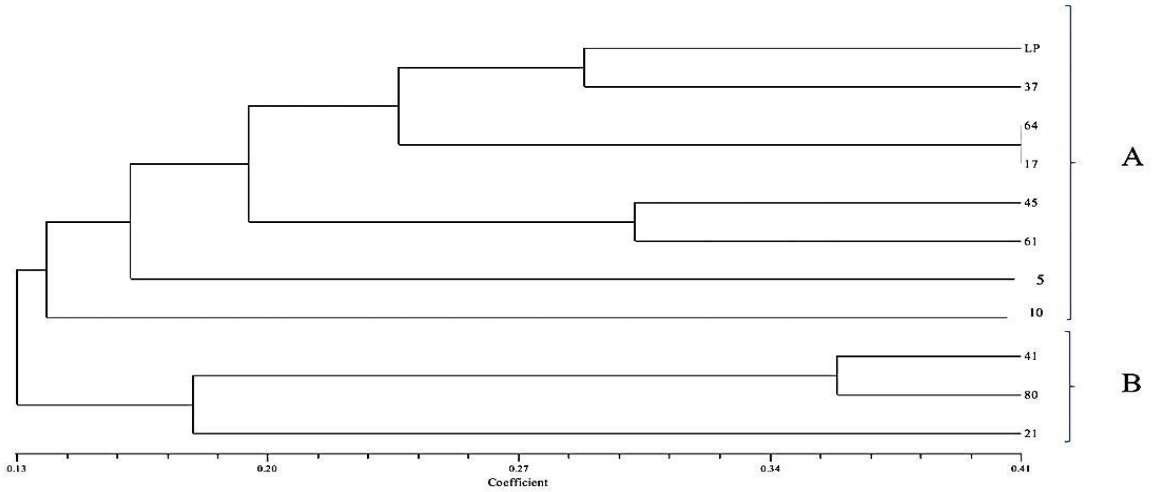
3. Minimum Inhibition Concentration
4. Minimum Bactericidal Concentration

5. Complete
6. Unweighted pair group method using artithmetic average (UPGMA)
7. Single linkage method
8. Simple Matching coefficient: (SM)

متفاوتی به دست آمد و در نهایت با توجه به مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتر (r=۰/۸۳)، ضریب جاکارد جهت بررسی میزان شباهت و روش کلینک جهت گروه-بندی افراد با استفاده از ماتریس شباهت انتخاب گردید. براساس ماتریس تشابه (شکل ۲) دو جدایه KAO ۶۴ و KAO ۱۷ بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند و در دندروگرام حاصل از روش کلنیک در یک گروه با کمترین فاصله قرار گرفتند. این شباهت احتمالا به دلیل یکسان بودن منبع جداسازی (زیتون تخمیری) این جدایه‌ها می‌باشد. علاوه بر این جدایه KMC ۳۷ نزدیکترین جدایه به باکتری استاندارد کلکسیونی بود. در گروه‌بندی ایجاد شده براساس روش کلینک دو شاخه اصلی A و B وجود داشت. شاخه اصلی A به ۵ زیرگروه شامل ۸ سویه جدا شده از زیتون تخمیری(۲)، پنیر کوزه(۳)، خمیرترش (۱)، شیر شتر(۱) و سویه استاندارد کلکسیونی و شاخه اصلی B به ۲ زیرگروه شامل ۳ سویه جدا شده از زیتون تخمیری تقسیم شدند. به طور کلی این نتایج حاکی از تنوع ژنتیکی در میان سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف بود.




شکل ۱- الگوی RAPD-PCR نژادهای مختلف *L. plantarum* ایجاد شده در حضور آغازگر P4 بر روی ژل آگارز پس از الکتروفورز. (ردیف ۱: کنترل منفی. ردیف ۲: الگوی حاصل از سویه *L. plantarum* مرجع. ردیف ۳ تا ۱۲: الگوی حاصل از ۱۰ جدایه مختلف *L. plantarum* مورد بررسی در این مطالعه. ردیف ۱۳: نشانگر مولکولی ۱kb)




شکل ۲- دندوگرام حاصل از ترکیب الگوهای RAPD-PCR نژادهای مختلف *L. plantarum* توسط آغازگرهای M13، P4 و P7

فعالیت همولتیک نژادهای مختلف *L. plantarum*

در مطالعه حاضر هیچ یک از سویه‌های مورد آزمون پس از رشد بر روی محیط کشت خون‌دار فعالیت همولتیکی نشان ندادند. در واقع همه نژادهای مختلف *L. plantarum*،

گاما-همولتیک بودند و سلول‌های خونی را هیدرولیز نکردند، بنابراین در اطراف کلنی‌های باکتریایی هاله‌ای مشاهده نشد.

مقاومت نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابرآنتی-بیوتیک‌های رایج

نتایج حاصل از ارزیابی مقاومت سویه‌های *L. plantarum* در برابر ده آنتی‌بیوتیک رایج، مشخص نمود که همه نژادهای مختلف *L. plantarum* مورد مطالعه در برابر آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مقاوم بودند. علاوه بر این همه جدایه‌ها به جز دو جدایه KAO ۶۴ و KMM ۵ در برابر آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و کانامایسین نیز مقاومت نشان دادند. تنها جدایه مقاوم در برابر آنتی بیوتیک کلیندامایسین نیز جدایه KMC ۳۷ بود. از سویی دیگر رفتار نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر آنتی بیوتیک جنتامایسین متفاوت بود. تمامی نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر مهارکننده‌های سنتز پروتئین (تتراسایکلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل، کلیندامایسین) و مهارکننده‌های سنتز دیواره سلولی (آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین) مشابه بود.

در این مطالعه شاخص MAR یا مقاومت چندگانه در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها برای کلیه سویه‌های مورد آزمون محاسبه گردید. این شاخص براساس نسبت تعداد آنتی بیوتیک-هایی که سویه مورد بررسی به آن ها مقاوم است به کل تعداد آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون محاسبه می‌شود. شاخص MAR برای ۵۰ درصد از نژادهای مختلف *L. plantarum*، ۰/۴ محاسبه شد. علاوه بر این دو جدایه KAO ۶۴ وKMM ۵ با کمترین شاخص MAR (۰/۱) بیشترین حساسیت را در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دادند.

جدول ۴- مقاومت به آنتی‌بیوتیک نژادهای مختلف *L. plantarum*

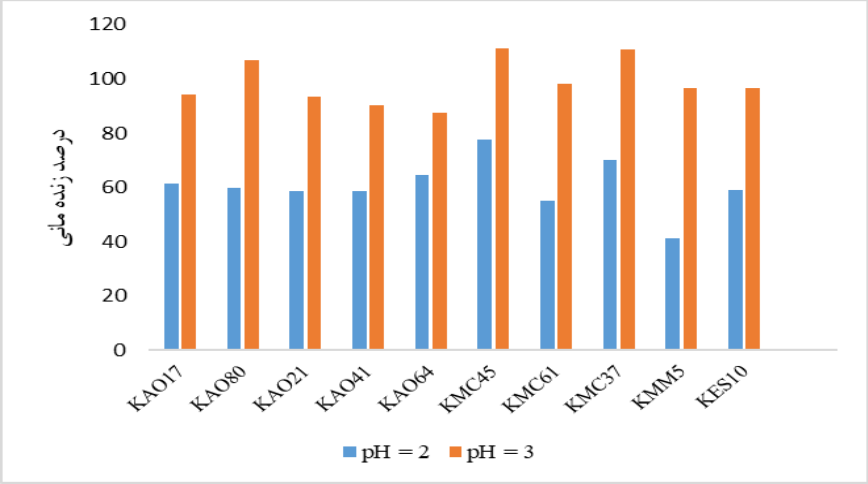
| کد نژادهای مختلف *L. plantarum* | آنتی‌بیوتیک | | | | | | | | | | شاخص |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | GM | AM | S | V | K | TE | CC | C | P | E | MAR |
| KAO۱۷ | M | S | R | R | R | S | S | S | S | S | ۰/۳ |
| KAO۸۰ | R | S | R | R | R | S | S | S | S | S | ۰/۴ |
| KAO۲۱ | R | S | R | R | R | S | S | S | S | S | ۰/۴ |
| KAO۴۱ | R | S | R | R | R | S | S | S | S | S | ۰/۴ |
| KAO۶۴ | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | ۰/۱ |
| KMC۴۵ | R | S | R | R | R | S | S | S | S | S | ۰/۴ |
| KMC۶۱ | S | M | R | R | R | S | S | S | M | S | ۰/۳ |
| KMC۳۷ | M | S | R | R | R | S | R | S | M | S | ۰/۴ |
| KMM۵ | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | ۰/۱ |
| KES۱۰ | M | S | R | R | R | S | S | S | S | S | ۰/۳ |

*TE= تتراسایکلین (30µg)، E= اریترومایسین (15 µg)، P= پنی سیلین (10 µg)، C= کلرامفنیکـــل (30 µg)، CC= کلـیندامایسین (2 µg)، K= کانامایسین (30µg)، V= ونکومایسین (30µg)، S= استرپتومایسین (10 µg)، AM= آمپی سیلین (10 µg)، GM= جنتامایسین (10 µg). ** S= حساس، M= نیمه حساس، R= مقاوم.

مقاومت در شرایط اسیدی

در این مطالعه تاثیر pH پایین (۲ و ۳) بر سطح زنده‌مانی ۱۰ سویه *L. plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق شکل ۳ تمامی نژادهای مورد بررسی *L. plantarum* توانستند شرایط اسیدی را تحمل کنند و در هر دو pH مورد آزمون ۲ و ۳ زنده بمانند. در مجموع طیف زنده‌مانی سویه‌های *L. plantarum*به ترتیب در pH های ۲ و ۳ بین ۷۷/۶۸-

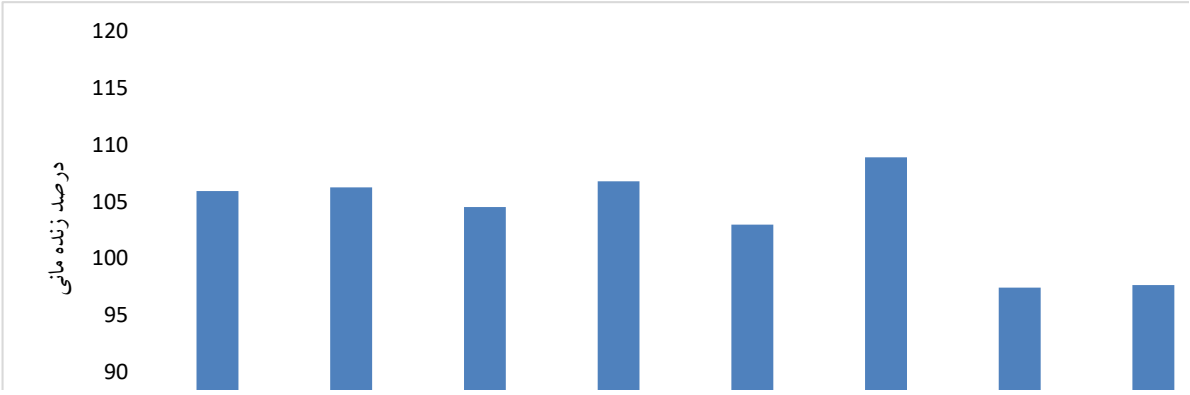
۴۱/۱۲ و ۹۰/۲۳-۱۱۱/۳۸ درصد بود. جدایه KMC ۴۵ بیشترین مقاومت را در برابر اسید از خود نشان داد. این سویه توانست در pH= ۲ به میزان ۷۷/۶۸ درصد زنده‌مانی داشته باشد و تنها ۱/۶۴ سیکل لگاریتمی کاهش نشان داد. علاوه بر این سویه‌های مورد مطالعه در محیط کشت مایع دارای pH= ۳ در مقایسه pH=۲ از مقاومت بیشتری برخوردار بودند و در برخی از موارد مانند نژادهای مختلف KAO۸۰، KMC ۴۵ و KMC۳۷ جمعیت نه تنها کاهش نیافت بلکه افزایش نشان داد.




شکل ۳- زنده مانی سویه های مختلف *L. plantarum* در شرایط اسیدی (pH= ۳و۲)

مقاومت در برابر نمک صفراوی

نتایج مربوط به آزمون مقاومت سویه‌های مختلف *L. plantarum* این پژوهش در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی در شکل ۴ مشاهده می‌شود. درصد زنده‌مانی تمامی سویه‌ها بیش از ۹۷ درصد محاسبه شد. بیشترین زنده‌مانی به ترتیب به سویه‌های KMM5 و KMC45 تعلق داشت. علاوه بر این تمامی سویه‌ها به جزء ۶۱ KMC و ۳۷ KMC به محیط حاوی ۰/۳ درصد نمک صفراوی نه تنها مقاوم بودند بلکه توانایی رشد تقریبا برابر با نمونه شاهد (فاقد نمک صفراوی) را داشتند، بنابراین این گونه‌ها بخوبی می‌توانند در روده کوچک زنده بمانند و فعالیت کنند.




شکل ۴- زنده مانی سویه های مختلف *L. plantarum* در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی

فعالیت ضدباکتریایی نژادهای مختلف *L. plantarum*

نتایج مربوط به بازداری از رشد دو باکتری شاخص بیماری‌زا در حضور درصدهای مختلف روماند فیلتر شده حاصل از هریک از نژادهای *L. plantarum* در روش میکرودایلوشن نیز در جدول ۵ مشاهده می‌گردد. طیف حداقل غلظت بازداری (MIC%) روماند فیلتر شده فاقد

سلول نژادهای *L. plantarum* علیه *L. monocytogenes* و *E. coli*، ۸۰-۲۰ درصد بود. در حالی که طیف حداقل غلظت کشندگی (MBC%) روماندهای فیلتر شده علیه دو باکتری مذکور ۱۰۰<-۳۰ درصد بود. همان طور که مشاهده می‌گردد، در اغلب موارد درصد حداقل غلظت بازداری روماندهای فیلتر شده از درصد حداقل غلظت کشندگی آن‌ها کمتر است. علاوه بر این درصد حداقل غلظت کشندگی برخی از سویه‌ها بیش از ۱۰۰ درصد (۱۰۰<) تعیین شد، که نشان از کم بودن غلظت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در این روماندها دارد و برای بهبود اثر بخشی تغلیظ این روماندها توصیه می-گردد. اختلاف مشاهده شده در میان سویه‌های مختلف *L. plantarum*، به دلیل تفاوت نژاد آن‌ها می‌باشد.

جدول ۵- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی روماند فیلترشده فاقد سلول جدایه‌های *L. plantarum* در روش میکرودایلوشن

| سویه میکروبی | *L. monocytogenes* | | *E. coli* | |
|---|---|---|---|---|
| | MIC(%) | MBC(%) | MIC(%) | MBC(%) |
| KAO۱۷ | ۸۰ | >۱۰۰ | ۸۰ | >۱۰۰ |
| KAO۸۰ | ۴۰ | >۱۰۰ | ۴۰ | >۱۰۰ |
| KAO۲۱ | ۳۰ | ۷۰ | ۳۰ | ۹۰ |
| KAO۴۱ | ۳۰ | ۷۰ | ۴۰ | >۱۰۰ |
| KAO۶۴ | ۳۰ | ۵۰ | ۳۰ | ۸۰ |
| KMC۴۵ | ۲۰ | ۳۰ | ۲۰ | ۳۰ |
| KMC۶۱ | ۴۰ | >۱۰۰ | ۴۰ | >۱۰۰ |
| KMC۳۷ | ۳۰ | >۱۰۰ | ۳۰ | >۱۰۰ |
| KMM۵ | ۳۰ | >۱۰۰ | ۳۰ | >۱۰۰ |
| KES۱۰ | ۶۰ | ۶۰ | ۷۰ | ۷۰ |

MIC= Minimum Inhibitory Concentration
MBC= Minimum Bactericidal Concentration

درون گونه‌ای در بین جدایه‌ها بهتر عمل می‌کنند (Di Cagno et al., 2010). ادسولوداهونسی و همکاران (۲۰۱۷) از روش‌های مختلف مولکولی شامل RFLP[9]، RAPD و PFGE[10] جهت تعیین تفاوت‌های درون گونه-ای سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از سه نوع غذای تخمیری نیجریه‌ای استفاده نمودند. آن ها هر سه روش را در تعیین تمایز بین گونه‌ای موفقیت آمیز گزارش کردند(Adesulu-Dahunsi et al., 2017) . تفویضی و همکاران (۱۳۹۰)، نیز تنوع ژنتیکی *lactobacillus* جدا شده از محصولات لبنی را توسط تکنیک RAPD-PCR مورد ارزیابی قرار دادند. این محققان کارایی ۲۰ آغازگر

## بحث

در این پژوهش RAPD-PCR به طور موفقیت آمیزی تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *L. plantarum* جدا شده از موادغذایی را نشان داد. به علاوه در مطالعات پیشین تکنیک RAPD-PCR به عنوان یک ابزار قدرتمند برای بررسی تمایز درون گونه‌ای سویه‌های مختلف باکتریایی معرفی شد. دی کانکو و همکاران (۲۰۱۰)، جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۷۲ جدایه *L. plantarum* که از میوه‌ها و سبزیجات مختلف جدا شده بودند از روش‌های فنوتایپینگ (سیستم بیولوژی) و ژنوتایپینگ (RAPD-PCR و AFLP) استفاده کردند. نتایج نشان داد که روش‌های مولکولی مثل RAPD-PCR و AFLP برای تعیین تمایز

9. Restriction Fragment Length Polymorphism
10. Pulsed-Field Gel Electrophoresis

آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند برای مقاصد پیش‌گیرانه و درمان عفونت‌های روده‌ای مورد استفاده قرار گیرد ( Tambekar & Bhutada, 2010). از سویی دیگر خطرات بالقوه انتقال جانبی ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک موجود در باکتری-های پروبیوتیک به باکتری های بیماری‌زا در روده موجب افزایش نگرانی شده است. بنابراین لازمه انتخاب سویه‌های پروبیوتیک فقدان ژن‌های قابل انتقال مقاومت به آنتی-بیوتیک در آن‌ها است (دستورالعمل EFSA، ۲۰۱۲). از این رو نوع مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های *Lactobacillus* جدا شده از منابع مختلف قبل از استفاده در صنایع غذایی باید مشخص شود. اساسا الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها به واسطه حضور ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ژنوم غیرکروموزومی یا پلاسمید است. علاوه بر این حضور این ژن‌ها در نواحی حفاظت شده ژنوم کروموزومی سویه‌های مختلف باکتری-های اسید لاکتیک نیز گزارش شده است. در مطالعات پیشین به مقاومت ذاتی *Lactobacillus* در برابر آنتی-بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند استرپتومایسین، کانامایسین و جنتامایسین به دلیل فقدان سیتوکروم‌های ناقل الکترون اشاره شده است. علاوه بر این مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های *Lactobacillus* به واسطه حضور اسید آمینه D- آلانین-D- لاکتات در پپتیدوگلیکان به جای D-آلانین- D-آلانین که مورد هدف آنتی‌بیوتیک است، می‌باشد. ژن‌های مقاومت به ونکومایسین نیز کروموزومی هستند و قابلیت انتقال به سویه‌های میکروبی دیگر را ندارند ( Argyri et al., 2013). در مطالعات مختلف حضور ژن مقاومت به آنتی-بیوتیک‌های تتراسایکلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین و ونکومایسین در ژنوم کروموزومی سویه-های مختلف *L. plantarum* گزارش شده است (Rojo-Bezares et al., 2006; Guo et al., 2017). در این مطالعه رفتار نژادهای مختلف *L. plantarum* در برابر آنتی بیوتیک جنتامایسین متفاوت بود در حالی که همگی در برابر آنتی بیوتیک ونکومایسین مقاومت نشان دادند. بر مختلف را جهت تشخیص تنوع درون گونه‌ای باکتری‌ها بررسی کردند و در نهایت روش‌های دقیق مولکولی را جایگزینی مناسب برای روش‌های وقت گیر و ابهام آمیز بیوشیمیایی دانستند. در مطالعه شعوری (۱۳۹۳) نیز به منظور شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از پنیر لیقوان و چال ابتدا از PCR مبتنی بر تکثیر جایگاه ژنی 16srRNA استفاده شد. سپس به منظور بررسی تنوع درون گونه‌ای سویه‌های شناسایی شده از ۴ آغازگر در روش RAPD-PCR استفاده گردید. در مجموع این نتایج نشان می‌دهد که روش RAPD-PCR روشی موثر در شناسایی و غربال‌گری جدایه‌ها از طریق بررسی تفاوت‌های درون گونه‌ای و شناسایی در حد نژاد می‌باشد و در مقایسه با روش‌های بیوشیمیایی نیاز به صرف وقت و هزینه کمتری دارد. از آنجا که صفات پروبیوتیکی وابسته به نژاد می‌باشند، بنابراین شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها از طریق آزمون‌های مولکولی امری ضروری به نظر می‌رسد.

عدم فعالیت همولتیک به عنوان یک پیش‌نیاز برای ایمنی سویه‌های پروبیوتیک منتخب به شمار می‌آید (FAO/WHO، ۲۰۰۲). در این مطالعه بررسی فعالیت همولتیک ده سویه *L. plantarum*، نشان داد که همه آن-ها فاقد فعالیت همولیز سلول‌های خونی بودند. نتایج مشابه‌ای توسط آرگوری و همکاران (۲۰۱۳) در مورد ۱۳ سویه *L. plantarum* جدا شده از زیتون تخمیری و همچنین آنگمو و همکاران (۲۰۱۶) در مورد کلیه باکتری-های اسیدلاکتیک شامل *Lactobacillus* جدا شده از غذاها و نوشیدنی‌های تخمیری سنتی هند گزارش شد . (Argyri et al., 2013; Angmo et al., 2016)

مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک در برابر طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها در طی درمان بیماران با آنتی‌بیوتیک‌های متعدد، می‌تواند در بهبود سریع‌تر بیماری به دلیل تشکیل و استقرار فلور میکروبی مطلوب در روده مفید باشد. مطالعات بسیاری استفاده همزمان از پروبیوتیک‌ها در درمان اسهال همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها را پیشنهاد کرده‌اند. بنابراین مقاومت سویه‌های پروبیوتیک در برابر برخی از

همکاران (۲۰۱۰) نیز طیف زنده‌مانی سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از سبزیجات تخمیری را به ترتیب در pH های ۲ و ۳ بین ۳۶-۱۸ درصد و ۷۹-۵۸ درصد گزارش کردند(Karasu et al., 2010) . این نتایج حاکی از مقاومت بالای سویه‌های *L. plantarum* در مطالعه حاضر نسبت به پژوهش‌های پیشین بود. علت تفاوت مشاهده شده در بین نژادهای مختلف در این مطالعه و دیگر پژوهش‌ها به دلیل تفاوت نژادی سویه‌های *L. plantarum*و تاثیر منشا جداسازی آن‌ها می‌باشد. مقاومت بالای نژادهای مختلف *L. plantarum* نسبت به سایر سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در مطالعات دیگر گزارش شده است. به عنوان مثال احمدی و همکاران (۱۳۹۵) در مطالعه‌ای ویژگی پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداشده از زیتون تخمیری را ارزیابی کردند. این محققان میزان افت جمعیت نژادهای مختلف *L. plantarum* را پس از قرارگیری در معرض pH= ۲/۵ را تنها یک سیکل لگاریتمی گزارش کردند. در حالی که دیگر نژادهای مختلف *L. brevis* و *P. ethanolidurans* به ترتیب سه و چهار سیکل لگاریتمی کاهش نشان دادند.

اسیدهای صفراوی از کلسترول در کبد سنتز می‌شوند و سپس از کیسه صفرا به فرم کنژوگه به دوازدهه ترشح می‌گردد، بنابراین غلظت آن در روده بین ۰/۳ تا ۰/۵ درصد است. اثر ضدمیکروبی نمک‌های صفراوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی حتی در غلظت‌های پایین به اثبات رسیده‌است(Dunne et al., 1999). گلیلند و همکاران (۱۹۸۴) غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی را به عنوان غلظت بحرانی برای ردیابی سویه‌های میکروبی مقاوم در برابر صفرا معرفی کردند (Gilliland et al., 1984).

این نتایج نشان داد که همه سویه‌های *L. plantarum* در این مطالعه نسبت به سایر گونه‌های پروبیوتیک شناخته شده *lactobacillus* در دیگر تحقیقات در برابر اسیدهای صفراوی مقاوم‌تر بودند. گایو و همکاران (۲۰۱۲) در این اساس می‌توان اطمینان حاصل کرد که مقاومت آنتی-بیوتیک مشاهده شده در نژادهای مختلف *L. plantarum* از نوع ذاتی و کروزومومی بوده و امکان انتقال این ژن‌ها به سایر باکتری‌ها وجود ندارد.

با توجه به این که باکتری‌های پروبیوتیک اغلب همراه مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند باید بتوانند برای رسیدن به روده و اعمال اثرات سلامتی بخش‌شان بر میزبان، به صورت زنده از معده عبور نمایند. بنابراین یکی از فاکتورهای مهم در انتخاب باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان پروبیوتیک حفظ بقا در شرایط گوارشی از جمله شرایط اسیدی معده (pH پایین) می‌باشد ( Dunne et al., 1999). سویه‌های مورد مطالعه در این پژوهش در محیط کشت مایع دارای pH=۳ در مقایسه pH=۲ از مقاومت بیشتری برخوردار بودند. همچنین در شرایط مذکور جمعیت سویه‌های KAO۸۰، KMC ۴۵ و KMC۳۷ نه تنها کاهش نیافت بلکه افزایش نشان داد.

توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک در تحمل شرایط اسیدی به سنتز ترکیبات پلی‌ساکاریدی مختلف که در حفاظت از غشای سلولی آن ها نقش دارد نسبت داده شده‌است. از سویی دیگر به نقش ترکیبات غذایی مانند پروتئین‌ها و همچنین ترکیبات موجود در شیره معده در محافظت از باکتری‌های پروبیوتیک در برابر اسیدکلریدریک معده اشاره شده است (Maragkoudakis et al., 2006). ساهادیوا (۲۰۱۱) و تورچی و همکاران (۲۰۱۳) نیز عنوان کردند که زنده‌مانی سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک تحت تاثیر pH قرار می‌گیرد و جمعیت باکتریایی در pH های ۲ و ۳ نسبت به pH=۷ به طور معناداری افت می‌کند (Sahadeva et al., 2011). همچنین نتایج مشابه‌ای در مورد زنده‌مانی سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از کیمچی نوعی غذای تخمیری کره‌ای، در شرایط اسیدی معده در مطالعه لی و همکاران(۲۰۱۶) به دست آمد (Lee et al., 2016). به طوری که درصد زنده‌مانی این سویه پس از ۳ ساعت قرارگیری در معرض pH= ۳، ۵۲/۵ و در pH= ۲ به میزان ۵/۶۲ درصد گزارش شد. کاراسو و

(Gänzle et al., 1999). در مطالعه آرگری و همکاران (۲۰۱۳) نیز ۱۲ گونه مختلف *Lactobacillus* شامل ۵ سویه *L. plantarum* و ۷ سویه *L. pentosus* از قابلیت هیدرولیز جزئی نمک صفراوی برخوردار بودند. همچنین جمعیت سویه‌های باکتریایی مذکور پس قرار گرفتن در معرض ۰/۳ درصد نمک صفراوی به مدت ۴ ساعت کمتر از یک سیکل لگاریتمی کاهش یافت (Argyri et al., 2013).

فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک از دیگر قابلیت‌های آن‌ها به شمار می‌آید که به توانایی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، استون، دی استیل، اسیدهای چرب، پپتیدها و باکتریوسین‌ها مربوط می‌شود (Herreros et al., 2005). در این مطالعه روماند حاصل از سویه‌های *L. plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف فعالیت ضدباکتریایی متفاوتی را در آزمون میکرودایلوشن در برابر باکتری های بیماری‌زا شامل *L. monocytogenes* و *E. coli* نشان دادند. بر این اساس سویه KMC ۴۵ جدا شده از پنیر کوزه بیشترین خاصیت بازدارندگی را علیه باکتری-های بیماری‌زا مورد مطالعه نشان داد. تاهور و همکاران (۲۰۱۶) نیز در بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضد بیوفیلم سه جدایه لاکتیکی علیه باکتری‌های عامل بیماری‌های دهان و دندان به نتایج مشابه‌ای دست یافتند (Taheur et al., 2016). این محققان نیز فعالیت ضدمیکروبی روماند فیلتر شده حاصل از سویه‌های مختلف لاکتیکی را علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی در آزمون میکرودایلوشن به دلیل قابلیت آن‌ها در تولید متابولیت های ضدمیکروبی مختلف، متفاوت ارزیابی کردند. به طور کلی نژادهای مختلف لاکتیکی این مطالعه از قابلیت مهارکنندگی بیشتری نسبت به سایر نژادهای مختلف لاکتیکی مطالعات مشابه مانند ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۶) و خشایی و همکاران (۱۳۹۶) در برابر باکتری‌های بیماری‌زا برخوردار بودند. از سویی دیگر در مطالعه زاگو و همکاران (۲۰۱۱) هیچ یک از ۹۸ نژاد *L. plantarum* جدا شده از مطالعه‌ای مشابه زنده‌مانی نژادهای مختلف *L. plantarum* جدا شده از دو نوع غذای تخمیری چین را ۷/۳۲-۲/۲ درصد گزارش کردند (گایو و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین لی و همکاران (۲۰۱۶) نرخ زنده‌مانی دو جدایه *L. plantarum* و *Leu. Mesenteroides* جدا شده از کیمچی در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی را به ترتیب ۵۸/۵۳ درصد و ۴۰/۳۱ درصد تعیین کردند (Lee et al., 2016). احمدی و همکاران (۱۳۹۵) در بررسی قابلیت رشد نژادهای مختلف لاکتیکی حاصل از زیتون تخمیری در حضور غلظت‌های بالای نمک صفراوی (۶-۱ درصد) در محیط کشت MRS آگاردار، نژادی از *L. plantarum* را به عنوان مقاوم‌ترین سویه در برابر نمک صفروای معرفی کردند. در پژوهشی دیگر کاراسو و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که مقاومت بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک در برابر نمک صفراوی به توانایی هیدرولیز نمک صفراوی و در نتیجه کاهش اثر بازدارندگی آن مربوط می‌شود (Karasu et al., 2010). بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک قادرند آنزیم هیدرولیز کننده نمک صفراوی را ترشح نمایند و نمک صفراوی کنژوگه را به فرم غیرکنژوگه و اسیدآمینه (گلایسین و تائورین) در آورند. با توجه به این که مقادیر بالای نمک صفراوی به فرم غیرکنژوگه می‌تواند برای سلامت افراد مشکل آفرین باشد، از این رو هنوز اثرات مطلوب هیدرولیز نمک صفراوی باکتری‌های پروبیوتیک مورد سوال و تردید است. با این حال غالب باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به دو جنس *Lactobacillus* و *Bifidobacteria* قادر به دهیدروکسیله کردن نمک صفراوی غیرکنژوگه نیستند. بنابراین بخش اعظم محصولات حاصل از هیدرولیز نمک صفراوی ممکن است که در مدفوع رسوب کرده و دفع گردد (Thomas et al., 2000). به علاوه دوتوت و همکاران (۱۹۹۸) و گانزل و همکاران (۱۹۹۹)، به نقش ترکیبات غذایی و ترکیبات محیط کشت در محافظت و افزایش مقاومت سویه‌های باکتریایی در برابر نمک صفراوی اشاره نموده‌اند (Du Toit et al., 1998;

محصولات تخمیری سنتی براساس روش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی. رساله دکتری. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۵۸.

۲. احمدی، زهرا. (۱۳۹۵). جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی غالب زیتون تخمیری واریته زرد و فیشمی و استفاده از آنها در تولید زیتون فرآوری شده. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۲۵.

۳. تفویضی، فرزانه؛ تاج آبادی ابراهیمی، مریم؛ حیدری نصرابادی، میترا؛ بهرامی، هدی. (۱۳۹۰). بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیل های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران توسط RAPD-PCR. تازه های بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی. ۱(۳)، ۴۲-۳۳.

۴. خشایی،مریم؛ صادقی، علیرضا؛ خمیری، مرتضی؛ کاشانی نژاد، مهدی؛ صادقی ماهونک، علیرضا. (۱۳۹۶). ارزیابی خواص ضد میکروبی پدیوکوکوس استیلسی جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران. ۱۲(۳): ص ۸۹-۹۸.

۵. شعوری، سیمین. (۱۳۹۲). ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی و آنتاگونیستی برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از پنیر لیقوان و چال. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۱۵.

۶. محمودی، ماندانا. (۱۳۹۷). بررسی ویژگی ضدسرطانی و سایر ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از فراورده‌های لبنی تخمیری سنتی. رساله دکتری. دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ص ۱۶۵.

**7.** Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., & Banwo, K. (2017). Genetic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains from some indigenous fermented foods in Nigeria. LWT - Food Sci Technol, 82, 199-206.

8. Angmo, K., Kumari, A., & Bhalla, T. C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid

پنیرهای ایتالیایی و آرژانتینی فعالیت بازدارندگی علیه باکتری‌های مذکور نشان ندادند (Zago et al., 2011).

## نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که بین ۱۰ سویه *L. plantarum* جدا شده از منابع مختلف غذایی تنوع نژادی وجود دارد و دو جدایه KAO۶۴ و KAO۱۷ با منشا یکسان جدا شده از زیتون تخمیری در آزمون RAPD-PCR بیشترین شباهت را دارند. علاوه بر این ویژگی پروبیوتیکی سویه‌های *L. plantarum* در سطح نژاد متفاوت بوده و تا حدی به منشا غذایی جداسازی شده مربوط می‌شد. نتایج تست ایمنی نشان داد که همه نژادهای مختلف *L. plantarum*، گاما-همولتیک بودند و سلول‌های خونی را هیدرولیز نکردند. همچنین همه سویه-ها از مقاومت ذاتی در برابر آنتی بیوتیک ونکومایسین برخوردار بودند و مقاومت آن‌ها در برابر سایر آنتی بیوتیک‌های رایج متفاوت بود. نتایج نشان داد که مقاومت همه سویه‌ها در برابر شرایط اسیدی pH =۳ بیشتر از ۲ =pH بود. سویه های جدا شده از پنیر کوزه شامل KMC۳۷ و KMC۴۵ از بیشترین مقاومت در برابر اسید برخوردار بودند. از سوی دیگر مقاومت در برابر۰/۳ درصد نمک صفراوی نشان داد که اختلاف معناداری از این نظر بین سویه‌های جدا شده از زیتون تخمیری وجود ندارد و سویه KMM ۵ بیشترین مقاومت را داشت. به علاوه فعالیت ضدمیکروبی سویه ها در برابر باکتری‌های بیماری-زای گرم مثبت *L. monocytogenes* و گرم منفی *E. coli* متفاوت بود و بیشترین فعالیت ضدباکتریایی به سویه KMC۴۵ تعلق داشت. بنابراین با توجه به هدف مورد نظر می‌توان از هریک از سویه‌های *L. plantarum* به عنوان کشت پروبیوتیک در صنایع غذایی یا دارویی استفاده نمود.

## منابع

۱. ابراهیمی، مریم. (۱۳۹۶). ارزیابی توانایی تولید باکتریوسین توسط آغازگرهای لاکتیکی جدا شده از برخی

bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT - Food Sci Technol, 66, 428-435.

9. Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., & Tassou, C. C. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiol, 33(2), 282-291.

10. Blagojev, N., Škrinjar, M. A. R. I. J. A., Vesković-Moračanin, S. L. A. V. I. C. A., & Šošo, V. L. A. D. I. S. L. A. V. A. (2012). Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. Rom Biotechnol Lett, 17(3), 7219-7226.

11. Bringel, F., Quénée, P., & Tailliez, P. (2001). Polyphasic investigation of the diversity within *Lactobacillus plantarum* related strains revealed two *L. plantarum* subgroups. Systematic Applied Microbiol, 24(4), 561-571.

12. Di Cagno, R., Minervini, G., Sgarbi, E., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., & Gobbetti, M. (2010). Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. Int J Food Microbiol, 143(3), 246-253.

13. Du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F & Holzapfel, W. H. (1998). Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. Int J Food Microbiol, 40(1-2), 93-104.

14. Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M. Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C, & Kiely, B. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. In Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications (pp. 279-292). Springer, Dordrecht.

15. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) (2012) Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA J 10(6):2740 [10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740.

16. FAO/WHO, 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

17. Gänzle, M. G., Hertel, C., van der Vossen, J. M., & Hammes, W. P. (1999). Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and Listeria in a dynamic model of the stomach and the small intestine. Int J Food Microbiol, 48(1), 21-35.

18. Gao, Y., Li, D., Liu, S., & Liu, Y. (2012). Probiotic potential of L. sake C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage. Eur Food Res Technol, 234(1), 45-51.

19. Garde, S., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Ávila, M. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. Food Control, 44, 22-25.

20. Gilliland, S. E., Staley, T. E., & Bush, L. J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct1. J Dairy Sci, 67(12), 3045-3051.

21. Guo, H., Pan, L., Li, L., Lu, J., Kwok, L., Menghe, B., Zhang, W. (2017). Characterization of antibiotic resistance genes from Lactobacillus isolated from traditional dairy products. J Food Sci, 82(3), 724-730.

22. Hartmann, H. A., Wilke, T., & Erdmann, R. (2011). Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. Int J Food Microbiol, 146(2), 192-199.

23. Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2005). Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol, 22(5), 455-459.

24. Karasu, N., Şimşek, Ö., & Çon, A. H.

(2010). Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from traditionally produced fermented vegetables. Annals Microbiol, 60(2), 227-234.

25. Kleerebezem, M., Boekhorst, J., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R. & Stiekema, W. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Proc Natl Acad Sci, 100(4), 1990-1995.

26. Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S. K., Heo, H. J., Kim, H. J., Ham, K. S., & Kim, J. H. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. LWT-Food Sci and Technol, 71, 130-137.

27. Lee, Y. K., & Salminen, S. (2009). Handbook of probiotics and prebiotics. John Wiley & Sons.

28. Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. Int Dairy J, 16(3), 189-199.

29. Mättö, J., Alakomi, H. L., Vaari, A., Virkajärvi, I., & Saarela, M. (2006). Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. Int Dairy J, 16(9), 1029-1037.

30. Rojo-Bezares, B., Sáenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2006). Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. Int J Food Microbiol, 111(3), 234-240.

31. Sahadeva, R. P. K., Leong, S. F., Chua, K. H., Tan, C. H., Chan, H. Y., Tong, E. V., Wong, S.Y.W & Chan, H. K. (2011). Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. Int Food Res J, 18(4).

32. Taheur, F. B., Kouidhi, B., Fdhila, K., Elabed, H., Slama, R. B., Mahdouani, K., Bakhrouf, A & Chaieb, K. (2016). Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. Microb Pathog, 97, 213-220.

33. Tambekar, D. H., & Bhutada, S. A. (2010). An evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections. Recent Res Sci Technol, 2(10).

34. Tamime, A. Y., Saarela, M. A. K. S., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005). Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. Probiotic Dairy Products, 3, 39-63.

35. Thomas, L. A., Veysey, M. J., Bathgate, T., King, A., French, G., Smeeton, N. C., Murphy, G.M. & Dowling, R. H. (2000). Mechanism for the transit-induced increase in colonic deoxycholic acid formation in cholesterol cholelithiasis. Gastroenterol, 119(3), 806-815.

36. Turchi, B., Mancini, S., Fratini, F., Pedonese, F., Nuvoloni, R., Bertelloni, F., Ebani, V.V. & Cerri, D. (2013). Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. World J Microb Biotech, 29(10), 1913-1922.

37. Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Noorbakhsh, H. (2018). Diversity and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Horreh, a Traditional Iranian Fermented Food. Probiotics Antimicrob Proteins, 10(2), 258-268.

38. Winslow, C. E., Broadhurst, J., Buchanan, R. E., Krumwiede, C., Rogers, L. A., & Smith, G. H. (1917). The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol, 2(5), 505-66.

39. Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. Food Microbiol, 28(5), 1033-1040.

# Evaluation of probiotic characteristics and intra-species diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different foods by RAPD-PCR

**Shahrampour D[1]*, Khomeiri M[2], Kashiri M[3], Razavi SMA[4]**

1. Ph.D. graduate of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

2,3. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources.

4. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad.

***Corresponding author:** *shahrampour@gau.ac.ir*

Received: 1 December 2020 Accepted: 1 March 2021

## Abstract

This study aimed to evaluate the intra-species diversity of 10 strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from different foods including fermented olives, jar cheese, camel milk, and sourdough, using the RAPD-PCR method and also to compare their probiotic potential. The results showed that different banding patterns were created by three types of primers for different strains and according to the similarity matrix drawn by NTSYS software based on Jacard coefficient, a total of 10 strains were divided into two main branches and seven subgroups. The two strains of KAO 17 and KAO 64 isolated from fermented olives were most similar. In addition, the probiotic properties of *L. plantarum* isolates were evaluated differently at strain levels. The results of immunoassay showed that all different strains of *L. plantarum* were gamma-hemolytic and resistant to vancomycin and their resistance to other common antibiotics was different. Strains isolated from jar cheese containing KMC 37 and KMC 45 had the highest acid resistance. On the other hand, resistance to 0.3% of bile salt showed that there was no significant difference in this regard between the strains isolated from fermented olives, and the KMM 5 strain had the highest resistance. In addition, the antimicrobial activity of the strains against gram-positive pathogenic bacteria *L. monocytogenes* and gram-negative *E. coli* was different, and the highest antibacterial activity belonged to the KMC 45 strain. Therefore, according to the intended purpose, each of the *L. plantarum* strains can be suggested as a probiotic culture in the food or pharmaceutical industries.

**Keywords:** *L. plantarum*, RAPD-PCR, intra-species diversity, probiotic properties.