Archive of SID

بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک دوغ محلی مشهد با استفاده از روش آنالیز ژن 16S rRNA و تعیین توانایی پروبیوتیکی سویه‌های جدا شده از آن

فریده طباطبایی یزدی*[۱]، علیرضا وسیعی[۲]، بهروز علیزاده بهبهانی[۲]، سید علی مرتضوی[۱]

۱- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(تاریخ دریافت: ۹۵/۰٤/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۰۱)

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های جدا شده از دوغ محلی ناحیه طرقبه مشهد می‌باشد. در این راستا ۹ نمونه دوغ محلی جمع آوری و آزمون‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی شامل رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، رشد در دمای ۱۰ و ٤۵ درجه سانتی گراد، تولید گاز دی اکسید کربن از گلوکز، رشد در غلظت نمک ٦/۵٪، رشد در pHهای ٤/٤ و ۹/٦ و هیدرولیز آرژنین جهت شناسایی تا حد جنس بر روی آن‌ها انجام گرفت. با استفاده از پروفایل تخمیر کربوهیدرات جدایه‌ها گروه بندی شدند و توالی یابی ژن 16S rRNA بر روی جدایه‌های انتخابی انجام پذیرفت. بر اساس نتایج آنالیز توالی یابی، ۸۷ جدایه به جنس‌های *لاکتوباسیلوس (پلانتاروم، اسیدوفیلوس، دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* و *کازئی* زیرگونه *کازئی)*، *لاکتوکوکوس (لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس* و *کرموریس)*، *انتروکوکوس (فاسیوم* و *دورانس)* و *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* تعلق داشتند. جهت ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها، آزمون‌های مقاومت به pH (۲/۵ و ۳/۵)، نمک صفراوی (غلظت های ۰/۰٦، ۰/۱۲۵ و ۰/۵ درصد) و همچنین بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها انجام پذیرفت. در نهایت از بین ۲۵ سویه مورد آزمایش جدایه‌های متعلق به *لاکتوباسیلوس (پلانتاروم* و *اسیدوفیلوس)* و *انتروکوکوس (فاسیوم)* ویژگی‌های بهتری از خود نشان دادند، به گونه‌ای که بیشترین پتانسیل پروبیوتیکی متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (AL35) بود. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد جدایه‌ها دارای فعالیت ضد باکتریایی قابل قبولی نیز می‌باشند، بنابراین با توجه به عوارض جانبی مصرف ترکیبات ضد میکروبی صنعتی و شیمیایی، می توان از این ریزاندامگان به عنوان تولیدکنندگان نگهدارنده طبیعی در محصولات غذایی مختلف استفاده کرد.

کلید واژگان: ژن 16S rRNA، باکتری‌های اسید لاکتیک، خواص پروبیوتیکی، فعالیت ضد باکتریایی.

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

امروزه نقش غذا در سلامت و تغذیه‌ی انسان در بسیاری از کشورهای پیشرفته دنیا، از اهمیت بسیاری برخوردار است. به طوری که نقش اولیه ی غذا به عنوان منبع تغذیه و رشد به نقش بیولوژیکی اجزای آن روی بهبود و پیشرفت سلامتی انسان تغییر یافته است. باکتری‌های اسید لاکتیک گروهی از باکتری‌های گرم مثبت غیر پاتوژن و غیر مخربی هستند که با توجه به قابلیت تخمیر قندها و تبدیل کردن آن‌ها به اسید لاکتیک به این نام شناخته شده اند [۱].

باکتری‌های اسید لاکتیک به علت تولید اسید و آروما در صنایع غذایی حائز اهمیت می‌باشند. این باکتری‌ها در کشاورزی وصنایع غذایی موارد استفاده متعددی پیدا کرده‌اند. در تهیه مواد خوراکی سیلو شده برای دام مانند سیب زمینی، ذرت، شبدر، یونجه و همچنین در تهیه ساورکراوت کاربرد دارند [۲].

مهمترین نقشی که ارگانیسم‌های خانواده لاکتوباکتریاسه در صنایع غذایی دارند تهیه فراورده‌های لبنی می‌باشد. پروبیوتیک ها مکمل های غذایی میکروبی هستند که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تاثیرات سودمندی بر میزبان دارند. این تعریف بر ماهیت زنده بودن پروبیوتیک‌ها تاکید دارد. مخمرها و باسیل‌های خاصی به عنوان پروبیوتیک در دسترس می‌باشند اما باکتری‌های اسید لاکتیک و بیفیدوباکترها[1] متداول ترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. بیش از ٪ ۹۰ فراورده‌های پروبیوتیک جهان حاوی جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* هستند [۳].

باکتری‌های عفونت‌زا و مواد سمی ایجاد شده در دستگاه گوارش انسان دو عامل مهم و اساسی در پیشرفت مرگ و میر در جوامع امروزی هستند و هر دو عامل می توانند تحت تأثیر باکتری‌های لاکتیکی قرار گرفته و کنترل شوند. سه مکانیسم برای پیشبرد این هدف وجود دارد: جلوگیری از اتصال باکتری‌های بیماری زا و عامل عفونت به سلول‌های اپی تلیال به وسیله جایگزین شدن در مخاط و اندام های بدن میزبان، تولید ترکیبات ضد میکروبی و دخالت در تنظیم سیستم ایمنی بدن [٤].

قبل از گسترش روش‌های مولکولی برای بررسی فلور و جمعیت باکتریایی یک نمونه‌ی غذایی حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک، روش‌های مبتنی بر کشت بیشترین استفاده را جهت شناسایی باکتریایی داشتند. ایراد اصلی روش‌های مبتنی بر کشت آن است که ممکن است خصوصیات فنوتیپی گونه های مختلفی از باکتری‌ها با هم مشابهت داشته باشد. بنابراین با درصد قطعیت بالایی نمی توان در مورد شناسایی یک سویه اظهار نظر کرد. همچنین به کارگیری روش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار وقت‌گیر و ابهام آمیز می‌باشد، علاوه بر این استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر کشت شناسایی تا مرحله گونه را ممکن می سازد [۵].

پیشرفت روش‌های مولکولی که باعث شناسایی و تمایز سریع و قابل اعتماد بین سویه‌های مورد بررسی می‌شود، باعث آن شده است که اکنون تعداد زیادی از روش‌های بر پایه‌ی ژنتیک مولکولی برای عملکردهای مختلف وجود داشته باشند. امروزه استفاده از روش‌های مدرن مولکولی خصوصا تکنیک‌های مولکولی مبتنی بر PCR از جمله توالی‌یابی ژن 16S rRNA جهت شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از اهمیت خاصی برخوردار شده است. این روش ابزار بسیار انعطاف پذیری را برای پژوهشگران فراهم کرده و اکنون هر آزمایشگاه تحقیقات زیست‌شناسی مولکولی به صورت رایج از PCR استفاده می‌نماید که اغلب برای رسیدن به اهداف خاص خود، روش‌های پایه‌ی PCR را اصلاح و تغییر می‌دهند [٦].

هدف از این پژوهش جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از دوغ محلی بود. سپس خصوصیات پروبیوتیکی این جدایه‌ها جهت معرفی آن‌ها به عنوان سویه‌های ایمن که توانایی استفاده در محصولات تخمیری صنعتی یا پروبیوتیکی را دارا می‌باشند، مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱-شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

۲-۱-۱-آزمون‌های مبتنی برکشت و شناسایی تا مرحله جنس

1. Bifidobacterium

www.SID.ir

Archive of SID

۹ نمونه دوغ با رعایت استانداردهای لازم به آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، منتقل شدند. ابتدا pH تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. تهیه سوسپانسیون باکتریایی از نمونه های دوغ با استفاده از محلول پپتون فیزیولوژیکی[2] (مرک، آلمان) انجام پذیرفت. جهت انجام آزمون های کشت میکروبی رقت سازی تا 10^{-7} انجام پذیرفت. از رقت‌های تهیه شده کشت سطحی بر روی محیط کشت MRS Agar (مرک، آلمان) در دو تکرار انجام گرفت. به این صورت که روی هر پلیت ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقّت ریخته و به کمک اسپریدر پخش شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰°C و ٤٥°C در حالت بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. از ایزوله‌هایی با ریخت شناسی متفاوت کشت مجدد به عمل آمد. این عمل تا ۳ تکرار به منظور اطمینان از خلوص هر ایزوله صورت پذیرفت. به منظور انجام آزمون‌های بعدی، سویه های خالص سازی شده در MRS broth حاوی گلیسرول ۱۵٪ (V/V) دردمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت انجام آزمون‌های مبتنی بر کشت ابتدا تست گرم و کاتالاز انجام پذیرفت. سپس تست‌های بیوشیمیایی شامل رشد در دمای ۱۰°C و ٤٥°C، رشد در غلظت نمک ٦/٥٪، رشد در pH های ٤/٤ و ۹/٦،آزمایش لوله دورهام جهت بررسی تولید گاز CO_2 و آزمون هیدرولیز آرژنین انجام پذیرفت [۷و ۸].

۲-۲-شناسایی مولکولی جدایه‌ها

از آنجا که برای تکثیر ناحیه‌ی 16S rRNA نیاز به DNAای می‌باشد که دارای بیشترین غلظت و کمترین مقدار بازدارنده‌ها باشد، بنابراین برای استخراج DNA ایزوله‌هایی که PCR در موردشان صورت پذیرفت، کیت‌های مخصوص استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت، با دیواره‌ی سخت (S-1030) (از شرکت دنازیست آسیا) ایران خریداری شد. دستورالعمل استفاده از این کیت شامل ۱۵ مرحله بود. طی این مراحل از بافرها و آنزیم‌هایی استفاده شد که محصول نهایی، DNA با درصد خلوص بالا بوده، که برای انجام واکنش PCR مناسب می‌باشد. پرایمرهای پیشرو (3- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG -5) و معکوس (3- GGTTACCTTGTTACGACTT -5)

2. Physiological Peptone Solution

جهت انجام فرایند PCR مورد استفاده قرار گرفتند. به طوری که محصول بدست آمده ۱۵۰۰ جفت باز طول داشت. حجم نهایی مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتر، که شامل آب (۱٦/٥ میکرولیتر)، بافر 10X (۲/٥ میکرولیتر)، dNTPs (۲ میکرولیتر)، $MgCl_2$ (۱/۲ میکرولیتر)، پرایمرهای رفت و برگشت (۱/۲٥ میکرولیتر)، پلیمراز *Taq* (۰/۲ میکرولیتر) (که همگی این مواد از شرکت دنازیست آسیا خریداری گردید) و DNA الگو (۱/٥ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی ذیل به دستگاه داده شد؛ فعال‌سازی در دمای ۹٥°C به مدت ٥ دقیقه (یک سیکل)؛ واسرشته‌سازی در دمای ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، اتصال پرایمر در دمای ٥٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه، (۳۳ سیکل)؛ توسعه نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، (یک سیکل). الکتروفورز با ولتاژ۹٥ ولت و زمان ٤٥ دقیقه در ژل آگاروز با غلظت ۱/٥٪، جهت مشاهده نتایج واکنش PCR انجام شد. بعد از مشاهده‌ی الگوی باندی مناسب و اطمینان از این موضوع که محصولات PCR آماده توالی یابی هستند ۲٥ عدد آمپلیکون یا محصول PCR انتخاب و توالی‌یابی گردید [۸-۱۰].

۲-۳-بررسی خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌های دوغ

با توجه به اینکه باکتری‌ها در دستگاه گوارش در معرض pH اسیدی معده و همچنین نمک‌های صفراوی کیسه صفرا قرار می گیرند، لذا مقاومت آن نسبت به این شرایط باید مورد آزمایش قرار بگیرد. برای تعیین توانایی رشد باکتری‌های اسید لاکتیک مشخص شده در pHهای متفاوت، کشت‌های فعال شده به لوله‌های MRS مایع که pH آن ها روی ۲/٥ و ۳/٥ تنظیم شده بودند، تلقیح شدند. لوله ها به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و تحت شرایط بی هوازی گرمخانه گذاری شدند. سپس رشد جدایه ها به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت [۱۱].

برای تعیین رشد جدایه‌ها در حضور نمک‌های صفراوی، کشت‌های فعال شده به لوله‌های حاوی MRS مایع که غلظت نمک صفراوی آن‌ها بر روی ۰/۰٦، ۰/۱۲٥ و ۰/٥۰ تنظیم شده بود، تلقیح شد. لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت گرمخانه گذاری شدند. نتایج به صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفتند [۱۲].

جهت تایید فعالیت پروبیوتیکی سویه‌های مورد آزمون، فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها از طریق روش Lawn on the spot مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، نخست جدایه‌های اسید لاکتیک و باکتری‌های پاتوژن شاخص (در محیط کشت اختصاصی) فعال‌سازی شدند. پس از قرار گیری باکتری‌های اسید لاکتیک در فاز لگاریتمی، ۵ میکرولیتر از آن‌ها را روی سطح محیط کشت BHI آگار نقطه‌گذاری و در دمای ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد مناسب جدایه های لاکتیکی، سطح محیط های کشت توسط یک لایه آگار نرم (حدوداً ۱۰ سی سی از agar ۰/۷ درصد +BHI) که به میزان ۰/۲۵ درصد با باکتری های شاخص ذکر شده تلقیح شدند، پوشانده شد. سپس پلیت‌ها در شرایط بهینه‌ی رشد میکروارگانیسم شاخص مورد استفاده، گرمخانه گذاری شده و بعد از ۸ الی ۲٤ ساعت خواص ضد باکتریایی آنها ارزیابی شد [۱۳].

آنالیز آماری

به منظور آنالیز آماری هر آزمایش سه بار تکرار شد. برای مقایسه میانگین ها از آزمون های ANOVA و دانکن و از نرم افزار SPSS 20 استفاده گردید.

۳- نتایج و بحث

نتایج تست‌های مبتنی بر کشت

جدایه‌های خالص سازی شده در ابتدا مورد آزمون گرم و تست کاتالاز قرار گرفتند. سویه‌هایی که گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند، به عنوان سویه‌هایی که پتانسیل قرار گرفتن در گروه باکتری‌های اسید لاکتیک را داشتند، انتخاب شدند. در جدول ۱ نتایج حاصل از تعیین pH نمونه های مختلف و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک که در دو دمای ۳۰ و ٤٥ درجه سانتی گراد و بر روی محیط MRS رشد کرده بودند، آورده شده است.

Table 1 The mean number of lactic acid bacteria and pH values of yogurt drink samples analyzed in this study

	Yogurt drink samples								
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
pH	4.14	4.07	5.25	4.48	4.30	4.86	4.09	3.65	4.22
MRS (**30°C**)	7.42±0.13[a]	8.05±0.22[a]	6.82±0.32[a]	7.02±0.20[a]	6.88±0.15[a]	6.12±0.30[a]	7.01±0.11[a]	7.00±0.12[a]	6.12±0.08[a]
MRS (**45°C**)	4.83±0.11[a]	4.56±0.20[a]	4.29±0.08[a]	3.12±0.22[a]	4.13±0.25[a]	4.05±0.16[a]	3.99±0.25[a]	4.12±0.42[a]	3.15±0.26[a]

S=Sample

Data within each row with the same lower case letter represent no significant difference (p<0.05).

بیشترین تعداد شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ۲ و بیشترین میزان شمارش باکترهای اسید لاکتیک در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ۱ می‌باشد.

با توجه به نتایج حاصل از تست های بیوشیمیایی، پروفایل‌های مختلفی به دست آمد که در هر گروه باکتری‌هایی که خصوصیات مشابهی دارند قرار گرفتند. ۸۷ جدایه‌ی انتخاب شده بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی در حد جنس شناسایی شدند. بر این اساس گروه یک دربرگیرنده‌ی باسیل‌های هوموفرمنتاتیوی بود که در دمای ۱۰°C و pH= ٤/٤ رشد کرده، امّا قادر به هیدرولیز آرژنین نبودند، این گروه به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هوموفرمنتاتیو شناسایی شدند. گروه دوم دربرگیرنده‌ی باسیل‌های هتروفرمنتاتیوی بود که آرژنین را هیدرولیز نموده و در دمای ۱۰°C و pH=۹/٦ به خوبی رشد می‌کردند، این گروه به عنوان لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو در نظر گرفته شدند. جدایه‌های هتروفرمنتاتیوی که قادر به هیدرولیز آرژنین نبودند، در دمای ۱۰°C قادر به رشد می باشد ولی ٤٥°C و pH=۹/٦ خیر، به عنوان لوکونوستوک در نظر گرفته شدند (گروه ۳). جدایه‌های جنس لاکتوکوکوس توانایی رشد در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد را داشته و قادر به هیدرولیز آرژنین بودند (گروه ٤). در نهایت

www.SID.ir

Archive of SID

کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و هوموفرمنتاتیوی که قادر به رشد در دماهای۱۰ و ٤٥ درجه سانتی گراد و غلظت ٦/٥ درصد نمک بودند به عنوان جنس انتروکوکوس در نظر گرفته شدند [۱۰].

Table 2 The results of biochemical tests

Group number	1[a]	2	3	4	5
Number of isolates	41	12	8	15	11
Growth at 10 ˚C	+	+	+	+	+
Growth at 45 ˚C	–	±	–	–	+
Growth at pH=4.4	+	–	±	–	+
Growth at pH=9.6	±	+	–	–	+
Growth at 6.5% NaCl	±	–	±	–	+
CO_2 from glucose	–	+	+	–	–
Hydrolysis of arginine	–	+	–	+	+

[a] The numbers of groups that isolates belonged them

سپس آزمون کربوهیدرات با استفاده از قندهای گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، مانیتول و ملبیوز انجام گرفته و بر اساس نتایج به دست آمده تمامی جدایه ها در ۹ گروه و در حد گونه طبقه بندی شدند (۱۳). سپس از هر گروه چند جدایه انتخاب و کلیه مراحل لازم برای شناسایی مولکولی از قبیل استخراج DNA، انجام واکنش PCR، الکترفورز و توالی یابی بر روی آن‌ها انجام شد. نتایج حاصل از تعیین توالی با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه شد.

بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز ژن 16S rRNA مشخص شد که ۱۹/٥٤ ٪ از جدایه‌ها متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ۱۷/۲٤ ٪ متعلق به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، ۱۲/٦ ٪ متعلق به *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *کازئی*، ۱۱/٤۹ ٪ متعلق به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، ۹/٦۰ ٪ متعلق به *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس*، ۷/٦٤ ٪ متعلق به *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*، ۷/٦ ٪ متعلق به *انتروکوکوس فاسیوم*، ٥/۰٤ ٪ متعلق به *انتروکوکوس دورانس* و ۹/۱۹ ٪ متعلق به *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* بودند. جنس لاکتوباسیوس در گذشته به عنوان مصرف کننده اسید فولیک مطرح بوده است. اما امروز تحقیقات نشان داده است این باکتری توانایی تولید اسید فولیک حتی در مقیاس کم و محدود را دارا می‌باشد که این موضوع ارزش تجاری این باکتری ها را مشخص می‌کند. قسمت‌هایی از مولکول 16S rRNA در بین گونه‌های باکتریایی محافظت شده است و می‌تواند جهت مقایسه و تطبیق ایزوله‌های مختلف به کار رود. تطبیق نواحی حفاظت شده، امکان مقایسه‌ی مابقی نواحی را که در بین بسیاری از گونه‌ها متفاوت می‌باشد، فراهم می‌آورد. از نقطه نظر عملی به کارگیری نشانگرهای الیگونوکلئوتیدی ویژه توالی‌های ژن 16S rRNA، یکی از بهترین گزینه‌ها جهت شناسایی باکتری‌ها براساس خصوصیات فیلوژنتیکی است و به عنوان یک روش قابل اطمینان جهت شناسایی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی توسط تکنیک‌های مبتنی بر PCR و یا نشانگرهای ویژه‌ی نوکلئوتیدی می‌تواند به کار گرفته شود [۱٥و ۱٤].

لطفی و همکاران (۱۳۸۹)، اقدام به شناسایی و جداسازی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی از فراورده‌های لبنی سنتی مناطق هریس و سراب کردند. به این منظور ابتدا باکتری‌های اسیدلاکتیک توسط روش‌های فنوتیپی جداسازی شدند و شاخص‌های اولیه‌ی پروبیوتیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای شناسایی دقیق‌تر با جفت پرایمرهای اختصاصی، ژن 16S rDNA باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و *انتروکوکوس* تکثیر داده شدند و سپس با استفاده از تکنیک RAPD تنوع داخل گونه‌های مشخص شده بررسی شد. در پایان تحقیق ۱٥ سویه لاکتوباسیلوس و ۱٦ سویه *انتروکوکوسی*[3] به عنوان فلور میکروبی طبیعی در این محصولات لبنی شناسایی گردیدند [۱٦]. قبادی دانا و همکاران (۱۳۹۱) اقدام به جداسازی و شناسایی مولکولی *لاکتوباسیل*‌های موجود در برخی فراورده‌های لبنی بومی نمودند. نمونه‌های مورد بررسی از قبیل ماست، دوغ و شیر از مناطق بکر استان‌های کرمانشاه، کردستان، لرستان، ایلام و مرکزی جمع‌آوری شد. جداسازی بر اساس روش‌های استاندارد بین المللی انجام شد. پس از انجام کشت‌های متوالی بر روی محیط‌های اختصاصی با کسب کلنی‌های مشخص و مشاهده میکروسکوپی، نود و سه باکتری

شناسایی بیوشیمیایی

3. *Enterococcus*

www.SID.ir

Archive of SID

سویه‌ها تخمیر ۱۹ قند، همچنین رشد در دمای ۱۵ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد، احیا نیترات، ذوب ژلاتین و واکنش در برابر اسکولین بررسی شد. به منظور تایید نتایج بیوشیمیایی، آنالیزهای مولکولی مانند تکثیر قطعاتی از DNA با پرایمرهای مخصوص انجام و تعلق این باکتری‌ها به جنس *لاکتوباسیل* تایید شد. همچنین توالی ژن 16S rRNA کامل چهار باکتری با ویژگی‌های خاص تکثیر و پس از توالی‌یابی در بانک ژن NCBI ثبت گردید. نتایج نشان داد که دو باکتری مورد بررسی متعلق به گونه جدید *لاکتوباسیلوس کراستوروم*[4] است [۱۷]. کولن[5] و همکاران (۲۰۰۰) از روش 16S rRNA (خصوصا ناحیه متغیر V1 و V2) برای شناسایی سوش‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* استفاده کردند. این روش به طور موفقیت‌آمیزی قادر به شناسایی طیف وسیعی از سوش‌ها بود. روش توالی‌سنجی ناحیه‌ی V3 ژن 16S rRNA برای تعیین دقیق تنوع *لاکتوباسیل*‌ها در کفیر به کار گرفته شد. همچنین از این روش برای شناسایی اختصاصی سوش‌های *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با توان تولید باکتریوسین بالا در آب پنیر استفاده شد [۱۸]. ساوادوگو[6] و همکاران (۲۰۰٤) فلور لاکتیکی نوعی شیر تخمیری از کشور بورکینافاسو[7] را شناسایی نمودند. دراین راستا، ناحیه‌ی بین 16S و rRNA 23S توسط PCR تکثیر شد. *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *اسیدوفیلوس* و *فرمنتوم*، همچنین *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، *پدیوکوکوس* و *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* شناسایی شدند، که خانواده‌ی *لاکتوباسیلوس* غالب بود (۱۹). در این پژوهش جنس *لوکونوستوک*، هر چند با فراوانی کم، ایزوله شد. اگر چه *لوکونوستوک* به علت نیازهای تغذیه‌ای بالا و پیچیده توانایی رقابت کمی در طول فرایند تخمیر دارد، اما بنظر می‌رسد سویه‌های این جنس نقش مهمی در ایجاد و گسترش طعم مطلوب داشته باشند. در اکثر فراورده‌های لبنی تخمیری جنس انتروکوک حضور دارد. برخی از محققان از نقش مثبت این باکتری در تکمیل فرایند تخمیر سخن گفته اند مانند تاثیر مثبت *انتروکوکوس فکالیس* بر روی کیفیت پنیر راکفورت و یا نقش سازنده انها در افزایش رشد سایر باکتری‌های اسید لاکتیک. از سوی دیگر تولید باکتریوسین‌ها توسط سویه‌های مختلف انتروکوک بر روی پاتوژن‌های احتمالی موجود در محصول نقش مخربی دارد و باعث افزایش ایمنی محصول می گردد. از آن طرف، برخی گزارش‌ها نیز حاکی از نقش مخرب از این باکتری‌ها، از جمله گسترش طعم تلخ در پنیر گورگونزولا دارد. باکتری *انتروکوکوس فکالیس* دارای ابعاد مختلفی جهت معرفی به عنوان سویه پروبیوتیک می‌باشد. امروزه کاربرد عملی آن به عنوان سویه پروبیوتیک در فراورده‌های دامی به اثبات رسیده است. همچنین احتمال انتقال پلاسمیدهای مقاوم به آنتی بیوتیک از این باکتری به سویه‌های پاتوژن که در فلور لاکتیکی روده محل بحث های فراوانی است و تحقیقات در این زمینه ادامه دارد [۲۰].

۳۹/۰۸ ٪ از جدایه‌هایی که بر روی محیط کشت MRS رشد کردند متعلق به جدایه‌های کوکسی شکل بودند. محیط کشت MRS به دلیل انتخاب پذیری پایین، امکان رشد سویه‌های کوکسی شکل را نیز فراهم می‌کند. باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* از استارترهای مهم در فراورده های لبنی به خصوص تولید ماست می باشد [۲۱].

به طور کلی روش‌های مبتنی برکشت و سنتی برای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک وقت گیر می‌باشند. همچنین نتایج حاصل از آن‌ها از دقت و صحت پایینی برخودار هستند. شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر بر اساس مورفولوژی و تنوع در سوبستراهای کربوهیدراتی استوار است. اما مشکل آزمون های فنوتیپی عدم تکرار پذیری در آزمایشگاه‌های مختلف است. یکی از دلایل این موضوع تنوع گونه‌ها می‌باشد. در این پژوهش نیز شناسایی سویه‌ها صرفا با استفاده از روش های فنوتیپی ممکن نبود چون تخمیر قندها در بسیاری از سویه ها دقیقا مشابه سویه خاصی در کتاب برگی نبود. روش های مولکولی اگر چه دقت بالایی در شناسایی دارند اما به علت تنوع روش و پایگاه های اطلاعاتی موجود که می تواند برای محقق گیج کننده باشد، استفاده همزمان از این روش‌ها توصیه می‌گردد [۲۳و ۲۲].

بررسی خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌ها

4. *Lactobacillus crustorum*
5. Kullen
6. Savadogo
7. Burkina Faso

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون‌های پروبیوتیکی بر روی ۲۵ جدایه‌ای که توالی یابی ژن 16S rRNA بر روی آن‌ها انجام پذیرفت، صورت گرفت. این جدایه‌ها شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (٦ جدایه)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (٤ جدایه)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (۳ جدایه) *لاکتوباسیلوس کازئی* (۲جدایه)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *کرموریس* (۲ جدایه)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیر گونه *لاکتیس* (۱ جدایه)، *انتروکوکوس فاسیوم* (۳ جدایه)، *انتروکوکوس دورانس* (۱ جدایه) و *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* (۳ جدایه) بودند.

شرایطی از قبیل pH پایین محیط می‌تواند باعث جلوگیری از متابولیسم و کاهش رشد و زنده مانی جدایه های اسید لاکتیکی گردد. برخی از اسیدها از قبیل هیدروکلریک اسید در معده انسان نیز وجود دارد که باعث نابودی بیومولکول‌هایی از قبیل پروتئین‌ها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. روزانه حدود ۲ لیتر شیره معده با pH نزدیک به ۱/۵ از سلول‌های پوششی به داخل معده ترشح می‌شود و شرایط سختی را برای زنده مانی میکروارگانیسم‌هایی که وارد معده می‌شوند فراهم می‌آورد. بنابراین مقاومت به شرایط اسیدی یکی از فاکتورهای مهم جهت پذیرش یک میکروارگانیسم به عنوان پروبیوتیک می‌باشد (٢٤). مقاومت و زنده‌مانی جدایه‌ها در pH پایین (۲/۵ و ۵ /۳) در این مطالعه مورد آزمایش قرار گرفتند. ٢٤ درصد از جدایه‌ها که متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بودند، توانایی رشد در pH=2.5 را داشتند. به غیر از *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* (۲ جدایه)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* (۲ جدایه)، *لاکتوباسیلوس کازئی* (۱ جدایه) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (۱ جدایه) بقیه سویه‌ها توانایی رشد در pH=3.5 را دارا بوند. بطور کلی لاکتوباسی ها نسبت به شرایط اسیدی مقاوم‌تر هستند که علت آن شرایط رشد و تخمیر می‌باشد که در محیط، شرایط اسیدی ایجاد می‌نمایند. لاکتوکوکوس‌ها نسبت به لاکتوباسیلوس ها به شرایط اسیدی حساس‌تر هستند. بنابراین باید اقداماتی از قبیل کپسولاسیون برای افزایش مقاومت آنها به شرایط اسیدی انجام داد. این فرضیه نیز وجود دارد که بعضی از ترکیبات در شیره معده ممکن است باعث افزایش مقاومت باکتری‌ها نسبت به شرایط اسیدی گردند (۲۵ و ۲٦). برکات و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند تولید ترکیباتی از قبیل پلی ساکاریدها باعث کاهش اثر کشندگی شرایط اسیدی می‌گردد. امروزه پذیرفته شده است مصرف غذاهای پروبیوتیک می‌تواند باعث افزایش pH معده به حدود ۳ شود. این افزایش pH زنده مانی پروبیوتیک‌ها را افزایش می‌دهد [۲۷].

برای بررسی پروبیوتیک بودن یک جدایه، بررسی مقاومت آن به نمک صفراوی مهم و ضروری می‌باشد. آن دسته از جدایه‌هایی که در غلظت‌های بالای نمک صفراوی مقاومت کنند می‌توانند در غلظت طبیعی صفرای سیستم معده‌ای روده ای انسان نیز زنده مانده و رشد نمایند. ترشح عصاره صفراوی به داخل دئودنوم بطور مستقیم باعث اختلال در رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود. اسیدهای صفراوی به علت دوقطبی بودن، فعالیت ضد میکروبی داشته و بعنوان یک دترجنت عمل می‌نماید که می‌تواند باعث اختلال در غشاهای بیولوژیک گردد [۲۸]. تمام سویه‌های مورد آزمون نسبت به نمک صفراوی در غلظت های ۰/۰٦ و ۰/۱۲۵ مقاومت نشان داده و رشد نمودند. ۹ جدایه شامل *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* (۳جدایه)، *انتروکوکوس دورانس* (۲جدایه)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (۱ جدایه) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۱ جدایه) توانایی رشد در غلظت ۰/۵ را نداشتند. دو عامل به میکروارگانیسم‌ها جهت رشد در غلظت‌های بالای نمک های صفراوی کمک می‌کنند. اولین عامل اثر حفاظتی ماتریکس غذایی می‌باشد و عامل دوم تولید آنزیم هیدرولیز کننده نمک صفراوی[8] است که می‌تواند نمک‌های صفراوی را به اسید آمینه و کلسترول تجزیه نموده و اثر سمی آن‌ها رو روی باکتری‌ها کم کند [۲۸و ۲۹].

با توجه به نتایج آزمون‌های مقاومت به pH و نمک صفراوی ٦ جدایه که نتایج بهتری از خود نشان دادند، انتخاب و فعالیت ضد باکتریایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های انتخاب شده اسید لاکتیک در جدول شماره ۳ آورده شده است. همانگونه که از نتایج مشخص است جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (AL35) بیشترین و *انتروکوکوس فاسیوم* (AD45) کمترین فعالیت ضد باکتریایی را از خود نشان دادند. نتایج نشان داده که باکتری‌های اسید لاکتیک

پاتوژن جلوگیری

8. Bile Salt Hydrolase Enzyme

www.SID.ir

Archive of SID

می‌کنند. تصویر هاله ممانعت از رشد سویه‌ها در برابر سویه بیماری زای *باسیلوس سرئوس* در شکل ۱، آورده شده است. نتایج نشان داد که جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با کد (AL35) بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را با قطر ۱۵/٤۲ میلیمتر در برابر سویه *باسیلوس سرئوس* از خود نشان داد، در حالی که جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* (AD45) با قطر ۸/۲۰ میلیمترکمترین هاله بازدارندگی را در برابر این سویه بیماری زا از خود نشان داد.

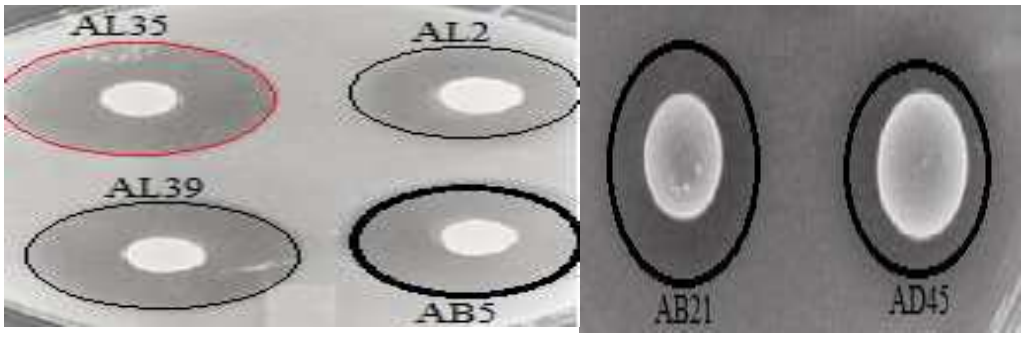

Fig 1 Average of inhibition zone (mm) of Lactic Acid Bacteria on *Bacillus cereus* ATTC 14579.

Table 3. Diameter of inhibition zone against indicator bacteria

Isolate number	LAB	Indicator Bacteria		
		Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Bacillus cereus* ATTC 14579	*Escherichia coli* ATCC 25922
AL2	*Lactobacillus plantarum*	10.45±0.15[a]	11.15±0.18[a]	8.12±0.23[a]
AL35	*Lactobacillus plantarum*	13.21±0.10[b]	15.42±0.25[b]	11.10±0.15[b]
AL39	*Lactobacillus plantarum*	11.03±0.13[a]	14.25±0.21[c]	10.04±0.40[c]
AB5	*Lactobacillus acidophilus*	10.08±0.15[a]	11.45±0.30[a]	7.12±0.40[a]
AB21	*Lactobacillus acidophilus*	8.28±0.18[c]	9.10±0.25[d]	6.24±0.17[d]
AD45	*Enterococcus faecium*	7.20±0.42[d]	8.20±0.24[e]	7.88±0.32[a]

Data within each column with the same lower case letter represent no significant difference (p<0.05)

همانگونه که از نتایج مشخص است جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (AL35) بیشترین و *انتروکوکوس فاسیوم* (AD45) کمترین فعالیت ضد باکتریایی را از خود نشان دادند. بوریس و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند جدایه‌های باسیل شکل جدا شده از فراورده‌های لبنی تخمیری اثر مهارکنندگی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا* و اشرشیا کلی دارد (۳۰). کاظمی درسنکی و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از روش دیسک و چاهک نشان دادند گونه‌هایی از باکتری‌های شناسایی شده شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* دارای اثر ممانعت کنندگی بر علیه باکتری‌های مولد بیماری و مسمومیت از جمله *اشرشیا کلی*، *شیگلا دیسانتری*، *باسیلوس سرئوس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۳۱). پروبیوتیک‌ها مکمل‌های میکروبی مفیدی هستند که می توانند باعث توازن فلور میکروبی روده شده و اثرات مفیدی بر جای گذارند. همچنین می توانند در نقاط مختلفی از بدن مانند دهان دستگاه گوارشی و دستگاه ادراری و

www.SID.ir

Archive of SID

تناسلی باعث جلوگیری از عفونت شوند. با توجه بـه آزمایـشات مختلفی که در این پژوهش بر روی سویه‌های اسید لاکتیک انجام گرفت اگر چه هر شش جدایه آورده شده در جـدول ۳ پتانـسیل پروبیوتیک بودن را دارنـد امـا جدایـه *لاکتوباسـیلوس پلانتـاروم* (AL35) بـه عنـوان سـویه‌ای کـه دارای بهتـرین ویژگـی‌هـای پروبیوتیکی بود، در نظر گرفته شد. هـر چنـد انجـام تـست‌هـای تاییدی بیشتر می تواند صحت و دقـت اسـتفاده از ایـن سـویه را برای کاربرد صنعتی آن افزایش دهد [۳۲] .

٤- نتیجه گیری کلی

به نظر می رسد که فرایند جمع آوری و شناسـایی سـویه‌هـای بومی از فراورده‌های تخمیری هر نقطه از کشور می تواند عـلاوه بر بررسی ویژگی‌های آن کـه باعـث حفـظ ذخـایر میکروبـی و ژنتیکی شده، اطلاعات مفیدی برای کاربردهای علمی و تجاری بخصوص در زمینه صنایع لبنی و بحث پروبیوتیک‌ها و غـذاهای عملگرا فراهم می‌نماید. شایسته است کـه سـاختاری منـسجم برای جمع آوری، حفظ و کـاربردی کـردن بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیک در کشور ایجاد گردد. یافته‌های بـه دسـت آمـده از ایـن تحقیـق نـشان مـی‌دهنـد کـه جدایـه‌هـا قـادر هـستند از رشـد باکتری‌های مسمومیت‌زا و بیماری‌زا جلوگیری نمایند. با توجه به عوارض جانبی مصرف ترکیبات ضد میکروبی صنعتی و شیمیایی، توصیه می شود از متابولیت‌های این میکروارگانیسم‌ها بـه عنـوان نگهدارنده طبیعی در محصولات غذایی مختلـف اسـتفاده گـردد. اگرچه امروزه اکثـر واحـدهای تولیـد کننـده فـراورده‌هـای لبنـی استارترهای خود را از خارج از مرزهای ایران وارد می‌کنند ولـی تحقیق و پژوهش در ارتباط با استفاده از سوش های داخلـی، بـا توجه به علاقه مندی عمومی به طعم محصولات لبنـی-تخمیـری سنتی، می‌تواند دریچه‌ای نو در زمینه بومی سازی تولیـد اسـتارتر در راستای اقتصاد مقاومتی باز نماید. سویه‌هـای شناسـایی شـده علاوه بر ویژگی پروبیوتیک بودن قابلیت‌هـای دیگـری از جملـه تولید اسید لاکتیک در مقیاس وسیع، تولید انواع باکتریوسـین‌هـا، تولید اگزوپلی ساکارید و.... را دارا می‌باشند که بررسی هر کـدام از این ویژگی‌ها می توانـد سرفـصل یـک تحقیـق جدیـد جهـت استفاده و حل کردن مشکلات صنعت کشور قرار گیرد.

٥- تقدیر و تشکر

مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهـشی بـا کـد مـصوب ۲/۳۹٦٤۹ در دانـشگاه فردوسـی مـشهد مـی‌باشـد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند کـه از معاونـت پژوهـشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت های مـالی لازم جهـت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Surono IS. (2003) In vitro probiotic properties of indigenous dadih lactic acid bacteria. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 16: 726-731.

[2] Šušković J, Kos B, Beganović J, Leboš Pavunc, A, Habjanič, K, Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity–the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology* 48: 296-307.

[3] Heller KJ. (2001) Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 374s-379s.

[4] Thirabunyanon M, Boonprasom P and Niamsup P. (2009) Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnology letters* 31: 571-576.

[5] Wang J, Xing Z, Tang W, et al. (2015) Isolation, identification, and potential probiotic characterization of one Lactococcus from kefir grain. *Food Science and Biotechnology* 24: 1775-1780.

[6] Ebrahimi MT, Ouweh AC, Hejazi MA, Jafari, p. (2011) Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. *African Journal of Microbiology Research* 5: 20-27.

[7] Spencer JF and de Spencer ALR. (2001) *Food microbiology protocols*: Springer Science & Business Media.

[8] Sengun IY, Nielsen DS, Karapinar M, et al. (2009) Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of Food Microbiology* 135: 105-111.

www.SID.ir

Archive of SID

identification of indigenous *Lactobacilli* in traditional dairy products in Iran. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology* 1(2): 99-116.

[18] Kullen, M. J., Sanozky-Dawes, R. B., Crowell, D. C., & Klaenhammer, T. R. 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. *Journal Appily Microbiology*, 89: 511-516.

[19] Savadogo, A., Cheik, A. T., Savadogo, P., Barro, N., Outtara, A. S., & Traore A. S. 2004. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3): 189-194.

[20] Salminen S, Von Wright A, Ouwenhand A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.2004;pp:225-230.

[21] Muyanja C, Narvhus J, Treimo J, Langsrud, T. (2003) Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80: 201-210.

[22] Lore TA, Mbugua SK and Wangoh J. (2005) Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *LWT-Food Science and Technology* 38: 125-130.

[23] Schillinger U. (1999) Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage. *International Journal of Food Microbiology* 47: 79-87.

[24] Papamanoli E, Tzanetakis N, Litopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou, P. (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat science* 65: 859-867.

[25] Ljungh A and Wadstrom T. (2006) Lactic acid bacteria as probiotics. *Current issues in intestinal microbiology* 7: 73-90.

[26] Salminen S and Von Wright A. (2004) *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*: CRC Press.

[9] Muyanja C, Narvhus J, Treimo J, Langsrud, T. (2003) Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80: 201-210.

[10] Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi A, Alegría Á, Nassiri MR, Bassami MR, Mayo B. 2012. Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy Science & Technology* 92(1): 75–90.

[11] Vasiee AR, Tabatabaee-yazdi F, Mortazavi A, Edalatian M.R. (2014). Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Lactobacillus spp. from Tarkhineh. *International Food Research Journal, 2,* 2487-2492.

[12] Sagdic O, Ozturk I, Yapar N, Yetim H (2014). Diversity and probiotic potentials of lactic acid bacteria isolated from gilaburu, a traditional Turkish fermented European cranberrybush (Viburnum opulus L.) fruit drink. *Food Research International* 64, 537-545.

[13] Yin Q and Zheng Q. (2005) Isolation and identification of the dominant Lactobacillus in gut and faeces of pigs using carbohydrate fermentation and 16S rDNA analysis. *Journal of bioscience and bioengineering* 99: 68-71.

[14] Vidhyasagar V and Jeevaratnam K. (2012) Isolation and characterization of Pediococcus pentosaceus from idly batter: a traditional South Indian fermented food source. *Biosciences Biotechnology Research Asia* 9: 427-43.

[15] Muyanja C, Narvhus J, Treimo J, Langsrud T. (2003) Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80: 201-210.

[16] Lotfi H, Hejazi MA, Maleki Zanjani B, Barzegari A. (2009) Isolation, biochemical and molecular identification of bacteria with probiotic potential of traditional dairy products of Harris and Sarab regions. *Journal of Food Industry Research* 3(1): 2-17.

[17] Ghobadi Dana M, Hatef Salmanian A, Yakhchali B. (2012) Isolation and

www.SID.ir

Archive of SID

[27] Barakat, O.S., Ibrahim, G., Tawfik, N., El-Kholy, W., & Gad El-Rab, A. (2011). Identification and probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from traditional Domiati cheese. *International Journal of Microbiology Research, 3*, 59-66.

[28] Shah N. (2000) Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83: 894-907.

[29] Bezkorovainy A. (2001) Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition* 73: 399s-405s.

[30] Boris S, Jimenez-Diaz R, Caso JL, Barbes C. Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delberueki sunsp. Lactis U0004. An intestinal isolate with probiotic potential. *Journal of Applied Microbiology* 2001; 91(2): 32-33.

[31] Kazemi Dorosnaki R, Ghaemi N, Mirpor M S. Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from probiotic products. *Journal of Microbial Biotechnology of Azad university* 2011; 7: 26-29.

[32] Hashemi, S. M. B., Shahidi, F., Mortazavi, A., Milani, N. & Eshaghi, Z. (2014). "Potentially Probiotic Lactobacillus Strains from Traditional Kurdish Cheese." *Probiotics and antimicrobial proteins, 6*, 22-31.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from local yogurt drink (Doogh), Using 16S rRNA Gene Sequence Analysis and Evaluation of their Probiotic Properties

, Vasiee, A. R. [2], Alizadeh Behbahani, B. [2], Mortazavi, A. [1*]Tabatabaei, Yazdi, F. [1]

1 Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2 Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2016/07/17 Accepted: 2017/02/19)

The aim of this study was to identify and then, evaluate the probiotic potential of the strains that isolated from local yogurt drink (Doogh) in Torghabeh, Mashhad. Nine local Doogh samples were collected and morphological and biochemical tests including Gram staining, catalase test, growth at 10 and 45 °C, Carbon Dioxide gas production from glucose, growth at concentrations of 6.5% NaCl, growth at pH 4.4 and 9.6 and hydrolysis of arginine to identify in genus level was performed. With using carbohydrate fermentation profiles, isolates were classified and sequencing of 16S rRNA gene was performed on selected isolates. These 87 strains were belonged to *Lactobacillus* (*plantarum*, *acidophilus*, *delbrueckii* subsp *bulgaricus* and *casei* subsp *casei*), *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis* and subsp. *cremoris*), *Enterococcus* (*faecium* and *durans*) and *Leuconostoc* (mesenteroides) respectively. To evaluate the probiotic characteristics of strains, resistance to pH (2.5 and 3.5), bile salt (concentration of 0/06, 0/125 and 0/5 %), and the antibacterial property of the isolates were performed. Finally, from these 25 isolates, *Lactobacillus* (*plantarum* and *acidophilus*) and *Enterococcus faecium* showed good probiotic properties, although the most probiotic potential belonged to *Lactobacillus plantarm* (AL35). The results of this study showed that isolates have high antibacterial activity. Therefore, considering the side effects of antimicrobial compounds and chemical industries, these microorganisms can be used as natural preservatives in various food products.

Keywords: 16S rRNA gene, Lactic Acid Bacteria, Probiotic Properties, Antibacterial Activity

*Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

www.SID.ir