

## غربال گری، شناسایی و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکسی های موجود در فرآورده لبنی سنتی سبزوار

سارا رشید<sup>۱</sup>، مهدی حسن شاهیان<sup>۲</sup>، محمدرضا سعیدی اصل<sup>۳</sup>، حسین استیری<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات سیرجان، سیرجان، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران  
<sup>۳</sup> دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، سبزوار، ایران  
<sup>۴</sup> مربی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، سبزوار، ایران

نشانی نویسنده مسؤول: سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، سارا رشید

E-mail: rashid.sara88@gmail.com

وصول: ۹۲/۹/۱۲، اصلاح: ۹۲/۱۱/۷، پذیرش: ۹۲/۱۲/۱۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های مفیدی هستند که اگر به تعداد کافی مورد استفاده قرار بگیرند دارای اثرات سلامت بخش خواهند بود. با توجه به گسترش فزاینده محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی، امکان از دست دادن بسیاری از باکتری های پروبیوتیک وجود دارد. بنابراین ضروری است این باکتری ها را از منابع سنتی شناسایی نموده و در تولید محصولات لبنی استفاده نمود. بنابراین هدف از این تحقیق غربالگری و شناسایی انتروکوک ها از کمه (فرآورده لبنی سنتی سبزوار) و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آن ها بود.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه نمونه گیری از چهار روستای مختلف انجام شد. سپس نمونه های جمع آوری و برای غربالگری در  $pH=4/5$  قرار داده شد. توانایی سویه های باقی مانده در  $pH$  برابر ۴ و غلظت ۰/۳٪ نمک صفر ارزیابی شد. بررسی اثر ضد میکروبی سویه های غربال شده در مقابل پاتوژن های سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورفوس با کمک روش دیسک پلیت سنجیده و در نهایت شناسایی سویه ها با روش PCR و تعیین توالی انجام شد.

**یافته ها:** نتایج این پژوهش نشان داد که ۳ گونه متفاوت انتروکوک شامل *E. faecium*، *E. avium* و *E. faecalis* در این فرآورده وجود دارد که دارای پتانسیل قوی پروبیوتیکی هستند به طوری که می توانند مقادیر بالای اسید و نمک صفراوی را تحمل کنند. کد EI بیش ترین قدرت مقابله با پاتوژن ها را نیز به اثبات رسانید.

**نتیجه گیری:** این بررسی نشان داد که کمه دارای انتروکوک هایی با پتانسیل پروبیوتیکی مناسب است و می تواند در سایر محصولات لبنی به عنوان مکمل اضافه شود.

**واژگان کلیدی:** استافیلوکوکوس اورفوس، انتروکوکوس، پروبیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم، کمه

### مقدمه

(بیوتیک) به معنی حیات بخش، منشاء گرفته است و

عبارتند از میکرو ارگانیسم های زنده که وقتی در مقادیر

واژه پروبیوتیک از دو کلمه یونانی (پرو) و

متعادل مورد استفاده قرار بگیرند، در سلامتی میزبان مفید خواهند بود (۱،۲،۳). تاکنون گونه های مختلفی از باکتری ها به عنوان پروبیوتیک معرفی شده اند ولی بیشتر پروبیوتیک های معرفی شده مربوط به جنس لاکتوباسیلوس ها بوده و کمتر به جنس انتروکوک ها توجه شده است. انتروکوک ها، کوکسی های گرم مثبت، فاقد اسپور و بی هوازی اختیاری هستند و در اثر فعالیتشان باعث افزایش طعم مواد غذایی می شوند (۴،۵). از خصوصیات پروبیوتیک مناسب، می توان به تحمل اسید و صفرا، ممانعت از رشد باکتری های بیماری زا و تعدیل سیستم ایمنی اشاره کرد (۶). محصولات لبنی، اکوسیستمی پیچیده از انواع گونه ها و سویه های باکتری های اسید لاکتیک است. این تنوع میکروبی جداسازی مستقیم باکتری پروبیوتیک از این محصولات را با مشکل مواجه ساخته است؛ به طوری که اغلب برای بررسی ویژگی های پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک از باکتری های ذخیره شده در کلکسیون میکروبی استفاده می گردد (۷). در واقع بررسی بقای سویه ها در سیستم گوارش از مهم ترین فاکتورهاست که مقاومت در برابر اسید و صفرا دو خصوصیت اساسی برای عبور از دستگاه گوارش است، از این رو اولین قدم در انتخاب ارزیابی خصوصیات پروبیوتیک، این فاکتور ها در نظر گرفته می شود. کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می کند و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله ی غلظت نمک های صفرا تعیین می شود. در دستگاه گوارش انسان میانگین غلظت نمک های صفراوی ۰/۳٪ وزنی/حجمی است و برای غربال سویه های مقاوم به صفرا بحرانی و کافی تلقی می شود. انتروکوک ها از طریق دکانژوگه نمودن اسید های صفراوی و بهبود سیستم ایمنی میزبان، اثر محافظتی خود را در مقابل سرطان ایفا می کنند (۴ و ۵ و ۸ و ۹).

از طرفی در سال های اخیر تاثیر بازدارنده برخی از پروبیوتیک ها بر روی تعدادی از باکتری های بیماری

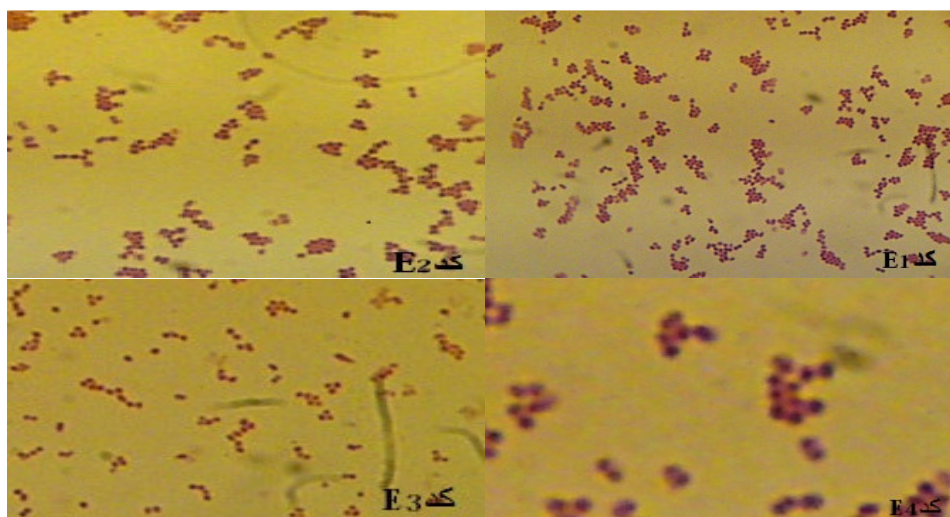
زای مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). مسمومیت های باکتریایی ناشی از مواد غذایی از مشکلات رایج در جامعه انسانی هستند که بخش عمده ای از آن ها توسط انتروتوکسین های استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می شوند (۱۱). تیفی موریوم نیز از خطرناک ترین سروتیپ سالمونلا برای انسان است که موجب بروز گاستروانتریت می شود که این بیماری در اثر مصرف غذای آلوده ایجاد می شود و رایج ترین عفونت غذایی را به خود اختصاص داده است (۱۲). پروبیوتیک ها از جمله انتروکوک ها با تولید باکتریوسین هایی مانند: انتروسین، نایسین، H<sub>2</sub>S فعالیت ضد باکتریایی بر علیه این پاتوژن ها دارند (۱۳، ۱۰).

هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی انتروکوک های برتر از کمه (فرآورده لبنی سنتی سبزوار) و آنالیز خصوصیات پروبیوتیکی آن که می تواند منجر به انتخاب باکتری های پروبیوتیکی با ویژگی هایی شود که تحمل شرایط بوم شناسی محصولات لبنی را داشته باشد و نیز به عنوان ابزاری برای انتقال پروبیوتیک های برتر به دستگاه گوارش مورد استفاده قرار گیرد.

## مواد و روش ها

### جمع آوری و آماده سازی نمونه

در این پژوهش از چهار روستای شهرستان سبزوار (طرسک، بید، صدخرو، دارین)، تحت شرایط استریل، نمونه کمه (فرآورده لبنی سنتی سبزوار) جمع آوری شد. ۱۰ گرم از نمونه جهت آماده سازی، با ۹۰ سی سی محیط پپتون واتر (Merck) همگن شد، سپس برای غنی سازی، ۱۰ سی سی از محلول همگن شده به ۱۰۰ سی سی محیط کشت MRS Broth (Merck) اضافه شدو در شرایط بی هوازی و CO<sub>2</sub> دار که با استفاده از گاز پک مهیا و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. باید اشاره کرد که در تمامی مراحل خالص سازی از آنتی بیوتیک نیستاتین برای کاهش مخمر استفاده شد.



تصویر ۱- تصاویر میکروسکوپی ۴ سویه مشکوک به انتروکوک

و شرایط بی هوازی و  $CO_2$  قرار داده شد. از کلنی های حاصل ۳-۵ بار کشت خطی داده شد و برای تایید جنس باکتری ها، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، رشد در  $pH=9/6$  رشد در  $6.5\%$  نمک سدیم کلرید، رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سانتیگراد انجام شد. در پایان کلنی های به دست آمده در  $25\%$  گلیسرول ذخیره سازی شد.

#### بررسی تحمل اسیدیته و نمک صفرای باکتری ها

جهت سنجش تحمل اسیدیته باکتری های جدا شده از نمونه، از MRS Broth غنی شده ی ۲۴ ساعته استفاده شد و تا  $10^{-5}$  رقت سازی در بافر  $PBS$  در  $pH=7$  انجام شد و از دو رقت آخر کشت سفره ای انجام شد. در مرحله دیگر ۱ سی سی از برات غنی شده، داخل ۲۰ سی سی بافر  $pH=4$  به مدت ۲ ساعت تحت شرایط بی هوازی و  $CO_2$  انکوبه شد و پس از زمان سپری شده رقت سازی تا  $10^{-5}$  انجام و از دو رقت آخر کشت صورت گرفت.

از کشت سویه های غربالگری شده اسیدی به محیط MRS Broth بدون نمک صفراوی و نیز محیط برات همراه نمک صفراوی  $0.3\% \text{Oxgall}$  تلقیح داده شد و جذب نوری آن در  $600$  نانومتر در بازه های زمانی صفر،  $168$ ،  $24$  خوانده شد. در پایان این مرحله نیز تست تخمیر قند گلوکز و هیدرولیز آرژنین انجام شد.

#### بررسی فعالیت ضد میکروبی

در این تست، سویه های پاتوژن سالمونلا تیفی

#### جداسازی باکتری های هتروتروف

برای جداسازی باکتری های هتروتروف  $1$  گرم از نمونه لبنی مورد نظر تحت شرایط استریل به لوله ای حاوی  $9$  میلی لیتر بافر فسفات سالین  $PBS$  افزوده و رقت سازی تا غلظت  $10^{-6}$  انجام گردید و پس از آن از سه رقت آخر به طور جداگانه به محیط پلیت کانت آگار استریل مذاب اضافه و کشت پور پلیت انجام و به مدت  $24$  ساعت در دمای  $37$  درجه سانتیگراد گرم خانه گذاری شد و با استفاده از رابطه زیر تعداد باکتری ها محاسبه گردید.

میانگین تعداد کلنی در  $3$  پلیت  $\times$  عکس ضریب  $= Cfu \text{ ml}^{-1}$

#### رقت $10 \times$ غربال انتخابی سویه های مقاوم به اسید

محیط کشت بعد از  $24$  ساعت غنی سازی، در دو فالكون استریل  $50$  سی سی، به مدت  $15$  دقیقه و با سرعت  $1000$  دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب با بافر نمک فسفات اسیدی  $pH=4.5$  به مقدار  $20$  میلی لیتر، به مدت  $2$  ساعت تحت شرایط بی هوازی و  $CO_2$  انکوبه شد. سپس محلول به مدت  $30$  دقیقه و در دور  $5000$  سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با بافر خنثی مجدداً سانتریفیوژ شد و در پایان  $5$  میلی لیتر باقی مانده به آرامی با رسوب مخلوط شد. سوسپانسیون باقی مانده در محیط  $KAA \text{ Agar (Merck)}$  کشت سفره ای و به مدت  $72$  ساعت، در دمای  $37$  درجه

محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ بارگذاری شد و سپس باند 1400bp از ژل آگاروز استخراج و جهت تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی درسایت بانک ژنی NCBI بلاست شده و قرابت بالاتر از ۹۷٪ به عنوان جنس و گونه مطرح گردید.

## یافته ها

### تعداد باکتری های هتروتروف نمونه ها

نتایج مربوط به شمارش باکتری های هتروتروف از فرآورده لبنی (کمه) مربوط به ۴ روستای متفاوت آب و هوایی بدین صورت بود که روستای طرسک، کد A با تعداد  $10^7 \times 9$ ، روستای بید، کد B با تعداد  $10^6 \times 9$ ، روستای صدخرو، کد C با تعداد  $10^7 \times 1$  و در انتها روستای دارین، کد D با تعداد  $10^7 \times 1/2$  بود.

### غربال انتخابی انتروکوک های مقاوم به اسید

شرایط اسیدی اعمال شده برای غربالگری انتروکوک ها  $pH=4/5$  در نظر گرفته شده بود که در این بین ۴ سویه باکتری مشکوک به انتروکوک با ویژگی های ظاهری متفاوت در محیط KAA Agar بعد از انجام کشت خطی متعدد برای خالص سازی، ظاهر شدند.

برای هر کدام از باکتری های رشد کرده در محیط افتراقی، تست ها جداگانه انجام شد. در ابتدا رنگ آمیزی گرم برای سویه ها انجام که نتایج نشان دهنده ی این بود تمامی گونه ها بنفش رنگ و در نتیجه گرم مثبت بودند (تصویر ۱). تست کاتالاز تمامی سویه ها نیز منفی بود. تست بعدی انجام شده، رشد در دمای ۴۵ درجه و ۱۵ درجه سانتیگراد بود که تمامی سویه ها قادر به رشد در این دو دما بودند (ویژگی انتروکوک ها). در تست رشد در  $pH=9/6$  تمامی ۴ سویه قادر بودند این شرایط بازی را تحمل و رشد نمایند. ۴ سویه مشکوک به انتروکوک ها، قادر به تجزیه قند گلوکز بودند و رنگ محیط را از آبی نفتی به سمت سبز کم رنگ سوق دادند ولی قادر به تولید گاز نبودند و نیز ۴ سویه قادر به رشد در مقدار ۶/۵٪ نمک

موریوم ATCC14389 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC18973 از دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شد و پس از غنی سازی ۲۴ ساعته پروبیوتیک ها، دیسک بلانک ها در عصاره های باکتری های پروبیوتیکی به مدت یک ساعت قرار گرفتند و سپس در فور دمای ۴۰ درجه با حفظ شرایط استریل منتقل شد تا کاملاً خشک شوند. سپس دیسک ها بر روی پلیت های کشت مولر هیتتون آگار، که به طور جداگانه به هر دو نوع پاتوژن، آغشته شده بودند، قرار گرفتند. در این مطالعه از دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاهد مثبت، و دیسک آغشته به متیل سولفاکساید به عنوان شاهد منفی آزمایش استفاده شد و قطر هاله اطراف دیسک بعد از ۲۴ ساعت با خط کش میلی متری اندازه گیری گردید.

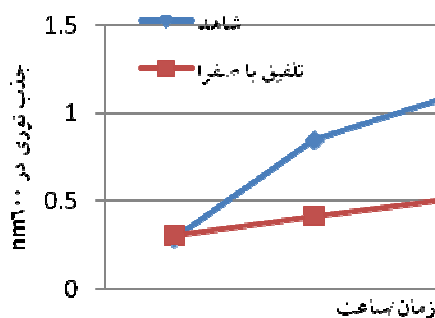
### شناسایی مولکولی پروبیوتیک ها

در این آزمایش برای شناسایی پروبیوتیک ها از روش مولکولی PCR استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA باکتری ها از کشت ۲۴ ساعته براث باکتری، و با استفاده از روش شیمیایی فنل-کلروفرم استخراج شد. سپس برای تعیین غلظت DNA استخراج شده، جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد و طبق فرمول زیر غلظت محاسبه شد (۱۴).

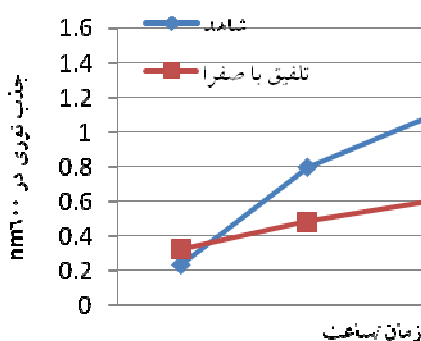
مقدار DNA بر حسب میلی گرم در میلی لیتر =

$$OD_{260} \times 50 / 1000$$

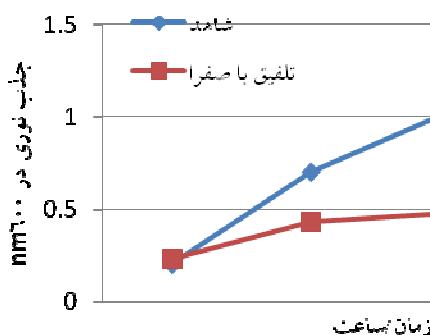
پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (۳')- Uni 1492\_R 5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-(Bac27\_F 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-۳' و با سفارش شرکت سینازن تهیه شد، یک جفت پرایمر بر اساس جدول (برای شناسایی ژن 16sRNA به کار گرفته شد. در برنامه PCR دمای دناتوراسیون ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل ها ۳۵، در نظر گرفته شد.



نمودار ۱: مقایسه ی شاهد کد E1 با نمونه همراه با ۰/۳٪ نمک صفرا



نمودار ۲: مقایسه ی شاهد کد E2 با نمونه همراه با ۰/۳٪ نمک صفرا



کد E1 و E3 در یک جایگاه قرار گرفتند، به طوری که کد E1، تعداد آن از  $36 \times 10^7$  قبل از تیمار به  $2 \times 10^7$  بعد از تیمار اسیدی رسید و کد E3 ه تعدادش از  $26 \times 10^7$  قبل از تیمار به  $2 \times 10^7$  بعد از تیمار رسید. کد E4 نیز بر اثر تیمار اسیدی از بین رفت، زیرا بعد از تیمار اسیدی هیچ کلنی مشاهده نشد و به همین دلیل این کد حذف شد.

تحمل ۳ سویه متفاوت پروبیوتیکی نسبت به نمک صفراوی ۰.۳٪، بر اساس جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر در بازه های زمانی (صفرا، ۸، ۱۶، ۲۴) به صورت جداگانه

NaCl که یکی از مشخصه های اصلی انتروکوک ها می باشد و هم چنین تمام سویه قادر به هیدرولیز آرژنین بودند.

### نتایج حاصل از تحمل اسید و نمک صفراوی

با مقایسه تعداد کلنی ها قبل و بعد از تیمار اسیدی مشاهده شد، بیش ترین تعداد زنده مانی مربوط به کد E2 می باشد زیرا مقدار آن از  $20 \times 10^7$  cfu/ml به  $4 \times 10^7$  رسیده بود و نسبت به ۲ کد دیگر کم ترین اختلاف تعداد را قبل و بعد از تیمار نشان داد. بعد از آن

جدول ۱: میزان مهار کنندگی سویه های جداسازی شده در مهار باکتری های بیماری زا بر حسب میلی متر

باکتری پروبیوتیکی	قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک به میلی متر	قطر هاله عدم رشد روی سالمونلا به میلی متر
کد E1	۲۳/۴±۱/۲	۱۶/۷±۱/۳
کد E۲	۱۲/۳±۱/۱	۵±۱/۳
کد E3	۱۵/۷±۱/۳	۷±۱/۳

(۴): کنترل مثبت (E. coli PTCC 12456)

داده های حاصل از تعیین توالی به وسیله نرم افزار بلاست مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و نتایج مشخص کرد که سویه E1 بالاترین همسانی (۹۹ درصد)، با جنس و گونه Enterococcus faecalis را داشت و سویه E2 بالاترین همسانی (۹۹ درصد)، با جنس و گونه Enterococcus faecium و در نهایت سویه E3، با جنس و گونه Enterococcus avium تطابق داشت. توالی های حاصل از سویه های جداسازی شده، همراه با توالی سویه استاندارد در نرم افزار MEGA-4 وارد گردید، قرا بت و نزدیکی سویه ها به صورت درخت فیلوژنی با روش Cluster W به دست آمد (تصویر ۳).

### بحث

رفتارهای فیزیولوژیکی برای حفظ بقاء باکتری های موجود در دستگاه گوارش، شامل مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک های صفراوی می باشد (۱۵). در این پژوهش، برای جداسازی باکتری های مقاوم به اسید، از محیط معدنی PBS با  $\text{pH}=4/5$  به مدت ۲ ساعت استفاده شد که بسیاری از باکتری های حساس به اسید از بین رفتند در واقع روش غربالگری اسیدی با توجه به بار میکروبی بالا در محصولات لبنی سنتی، می تواند روش مناسبی برای جداسازی و شناسایی باکتری های با پتانسیل پروبیوتیکی باشد و نیاز برای جداسازی مقدماتی و زمان بر جمعیت باکتریایی اولیه را برطرف می سازد. در این بررسی ۳ گونه متفاوت انتروکوک باکتری پروبیوتیک از جمله آویوم، فکاليس و فاسیوم وجود داشت. در کشورهای نظیر آلمان، فرانسه، استرالیا انواع مختلف

سنجیده شد (نمودار های ۱، ۲ و ۳). با توجه به نمودار ها، کد E2 بیشترین میزان زنده مانی را نشان داد به طوری که جذب نوری آن از ۱/۴۰۵ به ۰/۷۲۱ رسیده است و رتبه نخست را دارا می باشد.

### نتایج اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها

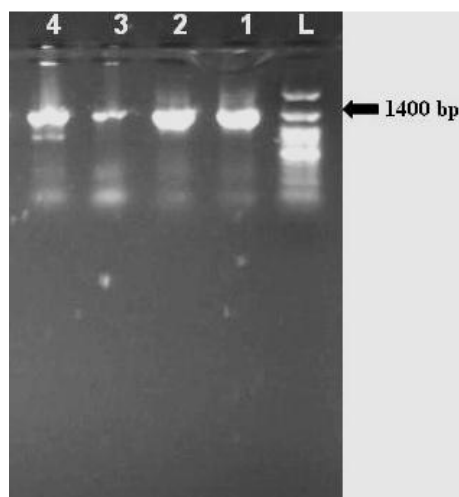
پس از ۳ بار تکرار هر آزمون، قطر هاله های ایجاد شده بر حسب میلی متر اندازه گیری و سپس میانگین داده ها برای هر سویه ی باکتری ثبت و با سویه های باکتری های دیگر مقایسه شدند. (جدول ۱).

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، ۳ کد مورد نظر تاثیر معنی داری در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم داشتند که به نظر می رسد این اثر مربوط به تولید مواد ضد میکروبی در این باکتری ها باشد.

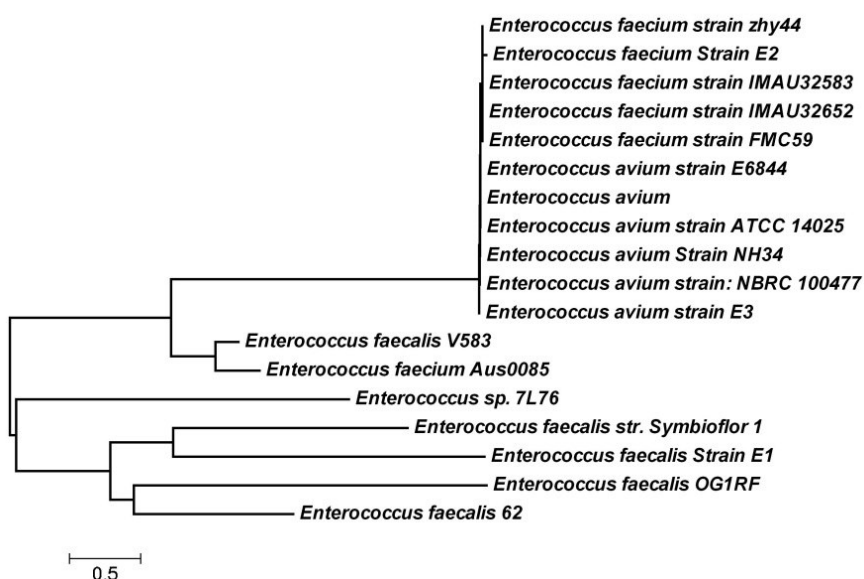
### شناسایی مولکولی پروبیوتیک ها

میزان DNA استخراج شده از باکتری های مولد پروبیوتیک از نظر کیفی و کمی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و بار گذاری در ژل بررسی شد و نتایج حاصله نشان داد که از کمیت مناسبی برخوردار بودند. شناسایی مولکولی باکتری های مولد پروبیوتیک با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rDNA با پرایمرهای ویژه این ژن (27F, 1492R) انجام شد. سپس محصول ۱۴۰۰ bp حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص سازی و تعیین توالی شد (تصویر ۲). توالی حاصله در بانک های ژنی، بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸٪) به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین گردید.

چاهک (L): DNA مارکر ۱۰۰ bp، چاهک (۱): سویه E1 چاهک (۲): سویه E2، چاهک (۳): سویه E3، چاهک



تصویر ۲: تصویر ژل الکتروفورز تکثیر ژن 16S rDNA جهت شناسایی مولکولی باکتری ها



تصویر ۳: دندوگرام مربوط به تحلیل آماری مربوط به ایزوله های جداسازی شده در مطالعه

علیه استافیلوکوکوس اورئوس داشته است (۱۷). در بررسی ما نیز با روش Blank disk به همین نتیجه دست یافتیم.

جعفری و همکارانش در سال ۱۳۹۱ از محصولات لبنی تخمیری سنتی شهرستان مغان جداسازی انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس اویوم را انجام دادند که ابتدا با کمک تست های بیوشیمیایی این گونه ها را شناسایی کردند و دریافتند که ۲۶ ایزوله در مقابل PH=2/5 پایدار بودند و ۱۰ ایزوله در مقابل غلظت ۰/۳٪ نمک صفراوی مقاوم بودند و نیز با روش چاهک خاصیت ضد میکروبی سویه ها را بر علیه

محصولات پروبیوتیک تولید می شود در حالی که در کشور ما هنوز تولید کنندگان مواد غذایی و لبنیاتی شناختی کامل از پروبیوتیک ها ندارند (۱۵).

لطفی و همکارانش در سال ۱۳۸۹ جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس پلانتروم و انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس را با کمک PCR انجام دادند (۱۶). در بررسی ما هم نیز همین پروبیوتیک ها با این روش ذکر شده جدا و شناسایی شدند ولی محصول لبنی ما متفاوت بود. Javed و سایرین در سال ۲۰۱۰، با استفاده از PCR انتروکوکوس فاسیوم را جدا و با روش Agar spot نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی در حدود ۱۳ میلیمتر بر

(۲۰، ۲۱، ۲۲). نتایج به دست آمده در رابطه با پروبیوتیک های جداسازی شده از محصولات لبنی مورد استفاده در این پژوهش یکسان است.

هر چند در این بررسی تعداد معدودی باکتری دارای پتانسیل پروبیوتیک به دست آمد ولی با شناسایی و شناخت آن ها می توانیم قدم های موثری در توسعه و بهره برداری از آن ها برداریم.

### نتیجه گیری

بر اساس یافته های این بررسی می توان ذکر کرد که محصول لبنی مناطق مذکور، منابع با ارزشی جهت جداسازی باکتری های پروبیوتیک هستند. سویه های جداسازی شده از این محصول سنتی مقاومت بهتری نسبت به شرایط اسیدی و نمک صفراوی نشان دادند و اثر آنتاگونیستی خوبی بر روی پاتوژن های مورد نظر داشتند که مربوط به باکتریوسین می باشد ولی باید مورد بررسی قرار گیرد و نیز پیشنهاد می شود با همکاری کارخانجات لبنی این سویه های پروبیوتیک به طور انبوه در محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله بر خود لازم میدانیم که از همکاری واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان- دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار و نیز دانشگاه باهنر کرمان که در اجرای این پژوهش ما را یاری نمودند کمال تشکر و سپاسگزاری را داشته باشیم.

لیستریا انتروکولیتیکا و اشرشیا کلی سنجیدند (۱۵). در بررسی مانیز همین باکتری ها با این نتایج جدا شدند ولی مقدار pH مورد نظر و پاتوژن ها متفاوت بودند و شناسایی شان بر پایه تکنیک PCR بود.

Rives و همکارانش در سال ۲۰۱۱، ۲۷ گونه انتروکوک از شیر و پنیر جدا کردند که ۲۲ گونه انتروکوک فاسیوم و ۵ سویه انتروکوک فکالیس و تست های شناسایی از قبیل رشد در دمای ۴۵ و ۱۰ درجه سانتی گراد، ۶/۵ NaCl/۹/۶ pH برای تایید بر شناسایی این سویه ها انجام شد. ممانعت کنندگی سویه های TW20، TW15، TW22 بر روی استافیلوکوکوس اورئوس حدود ۱۱/۵ تا ۱۳ را نشان دادند (۱۸). بررسی ما هم نیز به همین صورت انجام شد و به همین نتایج رسیدیم. Monteagudo-mera و همکارش در سال ۲۰۱۱، ثابت کردند که لاکتوکوکوس لاکتیس و انتروکوکوس فکالیس جدا شده بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا با استفاده از روش Agar spot ممانعت کنندگی معنی داری دارد (۱۹). در بررسی ما نیز این پروبیوتیک ها البته فقط بروی پاتوژن اولی، که صورت گرفت مطابق همین پژوهش اثر بازدارندگی وجود داشت ولی روش مورد استفاده ما متفاوت از این روش بود.

Harun al-Rashid در سال ۲۰۰۷، Lavanya و همکارانش (۲۰۱۱)، Abdi و همکارانش (۲۰۰۶)، باکتری های لاکتوکوکوس لاکتیس، انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از فرآورده لبنی سستی را نشان دادند که قادرند غلظت ۰/۳٪ صفرا و فقط اسیدیتیه مقدار pH=۴ را تحمل کنند و اسیدیتیه بیش تر از این مقدار را نمی توانند تحمل کنند

### References

- Gupta V, Garg R. Probiotics. Indian J Med Microbiol.2009; 27(3): 202-9.
- Baruzzi F, Poltronieri P, Marina Quero G, Morea M, Morelli L. An in vitro protocol for direct isolation of potential probiotic lactobacilli from raw bovine milk and traditional fermented milks. Appl Microbiol Biotechnol.2011;90(1):331-42.
- Songisepp E, Kullisaar T, Hutt P, Elias P, Brilene T, Zilmer M, Mikelsaar M. A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. J Dairy Sci.2004; 87(7):2017-23.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology.2009; 155 (6): 1749-57.



5. Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiol.*2012; 30(1) :59-67.
6. Both E, György E, Z. Kibédi-szabó C, Tamás E, Ábrahám B, Miklóssy I, Lányi S. Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. *U.P.B. Sci Bull, Series B.*2010; 72(2):37-44.
7. Olfat s, Barakat, Ibrahim GA, Tawfik NF, El-Kholy WI, Gad el-rab DA . Identification and probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from traditional domiati cheese. *Inte J Microbiol Res.*2011;3(1): 59-66.
8. Bhardwaj A, Gupta H, Kapila S, Kaur G, Vij Sh, Kumar Malik R. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *Inte J Food Microbiol.*2010;141(3) :156–64.
9. Renye JA Jr, Somkuti GA, Paul M , Van Hekken DL. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolatfrom Hispanic-style cheeses. *J Indian Microbiol Biotechnol.*2009;36(2):261–8.
10. Wysong C. Rationale For Probiotic Supplementation. *Wysong Corporation.*2006;1-9.
11. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Inte J Food Microbiol.* 2009;131(1):30–9.
12. Monadi A.R, Mirzaei H , Javadi A , Hosseinzade N, Amjadi Y . Effect of some probiotics on *Salmonella typhi* during associated growth in milk. *African J Microbiol Res.*2010;3(24):2708-11.
13. Devriese L, Baele M, Butaye P. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. *Prokaryotes* ,2006; 4:163–74.
14. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning III: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.2001;1115.
15. Jafari B, monadi A, Rezayi A, Alizadeh S, Ahmadizadeh CH, Pashazadeh M, Barzegar A, Jafarzadeh H. Assessment of potential probiotic *Enterococci* isolated from traditional dairy products( Moghan and Meshginshahr). *J Veterinary Med, IAUT.* 2013;6(1):1505-13. [Persian].
16. Lotfi H, Hejazi A, Maleki zanjani B, Barzegari A. Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Potentially Probiotic Bacteria from Traditional Dairy Products from Heris and Sarab Regions. *Res J Food.*2010;3(1): 1-17. [Persian] .
17. Javed I, Ahmed S, Manam S, Riaz M, Ahmad B, Ali MI, Hameed A, Chaudry GJ. Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of a Bacteriocin from Newly Isolated *Enterococcus faecium* IJ-31. *J Food Prot.*2010; 73(1) :44–52.
18. Rivas FP, Castro MP, Vallejo M, Marguet E, A. Campos CA. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT - Food Sci and Tech.*2012;46(2) :428-36.
19. Monteagudo-mera A, Caro I, Rodri L, Aparicio G, Ru A , Ferrero M, Garci a-armesto M. Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products. *J Food Protec.*2011; 74( 8):1379–86.
20. Harun-ur-Rashid Md ,Togo K , Ueda M ,Miyamoto T. Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk 'Dahi' in Bangladesh. *Pakistan J Nut.*2007; 6 (6): 647-52.
21. Lavanya B, Sowmiya S, Balaji S , Muthuvelan B. Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk. *British J Dairy Sci.*2011; 2(1): 5-10.
22. Abdi R., Sheikh-Zeinoddin M and Soleimani-Zad S. Identification of lactic acid bacteria from traditional Iranian lighvan cheese, *Pakistan j biological sci.*2006;9 (1): 99-103.

# Screening, identification and evaluation of probiotic potential of Enterococci in traditional dairy products of Sabzevar

**Sara Rashid., MSc**

MSc of Microbiology, Islamic Azad University, Sciences & Research, Sirjan, Iran

**Mahdi Hasanshahian., PhD**

Assistant Professor, Department of Biology, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

**Mohammad Reza Saeidi-asl., PhD**

Associate Professor, Department of Food Sciences & Technology, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

**Hossein Estiri**

Instructor, Department of Food sciences & Technology, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

Received:03/12/2013, Revised:27/01/2014, Accepted:01/03/2014

## Corresponding Author:

Sara Rashid, Department Of Microbiology, Islamic Azad University, Sciences & Research, Sirjan, Iran.  
E-mail:s.rashid@srbiau.ac.ir

## Abstract

**Background:** Probiotics are beneficial microorganisms that will be health effects, if be used in a sufficient amount. Due to the growing use of industry dairy, rather than traditional products, there is the possibility of losing a lot of probiotic bacteria. It is, therefore, essential to identify the bacteria from traditional sources and use them in the production of dairy products. The aim of this study was to screen and identify Enterococci from KAMEH (a traditional dairy product of Sabzevar), and evaluation of their probiotic potential.

**Material and Methods:** In this study, sampling was carried out from four different villages. For screening, the collected samples were placed in pH 4.5. The remained strains were evaluated in pH 4 and 0.3 % bile salt. Antimicrobial activity of screened strains was analyzed against *Salmonella typhimurium* and *staphylococcus aureus* using disc plate method. Finally, the strains were identified by PCR and sequencing techniques.

**Results:** The results showed that three different species of Enterococci, including *E. faecium*, *E. avium* and *E. faecalis*, exist in KAMEH, which have a strong probiotic potential, such that they can withstand high levels of acid and bile salts. E1 code had most antimicrobial activity.

**Conclusion:** This study revealed that KAMEH has Enterococci with appropriate probiotic potential, and can be added as a supplement to other dairy products.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, *Entrococcus*, *Probiotic*, *Salmonella typhimurium*, KAMEH