

جداسازی باکتری *Enterococcus sp. 7C37* با توانمندی پروبیوتیکی بالا از پنیر قاینی به عنوان یک محصول تخمیری لبنی در استان خراسان جنوبی



سارا طالبی، علی مخدومی* و معصومه بحرینی

ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

پروبیوتیکها میکروارگانیسمهایی با اثرات مفید بر سلامت انسان هستند. جداسازی باکتریهای جدید با توانمندی پروبیوتیکی موجب گسترش کارایی این گروه از میکروارگانیسمها در سلامت انسان و حیوانات می گردد. هدف مطالعه حاضر جداسازی و ارزیابی توانمندی پروبیوتیکی باکتریهای به دست آمده از پنیر قاینی در استان خراسان جنوبی است. صفات پروبیوتیکی شامل: مقاومت به اسید، مقاومت به صفرا، حساسیت به آنتی بیوتیک، مهار رشد باکتریهای بیماری زا، آب گریزی سطحی، خودتجمعی و آنتی اکسیدانی در جدایه های منتخب به دست آمده از این پنیر سنتی ارزیابی شد. از ۹۶ جدایه باکتری به دست آمده ۳۰ جدایه متفاوت جهت ارزیابی صفات پروبیوتیکی انتخاب شدند. از این تعداد ۵ جدایه قادر به رشد پس از ۲ ساعت نگهداری در شرایط اسیدی (pH=۲) و تحمل صفرا بوده و مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند. به غیر از مقاومت یک جدایه به کلرامفنیکل بقیه جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای به کار برده شده حساس بودند. بیشترین اثر ضد میکروبی این جدایه ها بر علیه باکتری *E. coli* و *Bacillus subtilis* بود. جدایه 7C37 متعلق به جنس *Enterococcus* با ۸۸ درصد تحمل اسید، ۴۴ دقیقه تأخیر رشد در حضور صفرا، حساسیت نسبت به تمامی آنتی بیوتیکها، اثر ضد میکروبی بر علیه سه باکتری بیماری زا، ۱۸/۹ درصد قدرت خودتجمعی، ۸۱/۵ درصد آب گریزی سطحی و ۳۸ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در مجموع بیشترین توانمندی پروبیوتیکی را دارا بود. باکتریهای به دست آمده از این پنیر سنتی با دارا بودن صفات لازم می توانند به عنوان انواع پروبیوتیک مورد توجه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: انتروکوکوس، پروبیوتیک، پنیر قاینی، غذای تخمیری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۸۸۰۵۵۱۸، پست الکترونیکی: a.makhdomi@um.ac.ir

مقدمه

درمان اسهال، کاهش عدم تحمل لاکتوز، کاهش عوارض بعد از عمل، اثرات ضد میکروبی، تأثیر در درمان سرطان روده بزرگ و کاهش علائم روده تحریک پذیر اثبات شده است (۱۰). همچنین امروزه با در نظر گرفتن محور روده - مغز به تأثیر پروبیوتیکها بر صفات ذهنی و خلقی اشاره می شود (۱۷). صفات لازم برای یک میکروارگانیسم پروبیوتیک عبارت اند از: (۱) باید به عنوان میکروارگانیسم ایمن شناخته شده باشد. (۲) باید توانایی تحمل بالایی نسبت به

واژه پروبیوتیک (برای حیات) اولین بار در سال ۱۹۵۴ به هنگام مقایسه اثر آنتی بیوتیکها با ترکیبات دارای عمل مطلوب بر میکروارگانیسمهای دستگاه گوارش و در مقابل لفظ آنتی بیوتیک (ضد حیات) به کار برده شد (۲۱). سازمان بهداشت جهانی پروبیوتیکها را این گونه معرفی کرده است: میکروارگانیسمهای زنده که به دنبال تجویز به میزان کافی مزایای سلامت برای میزبان به همراه دارند (۹). با مطالعه در مدل‌های انسانی و حیوانی نقش پروبیوتیکها در

موجود است. استانهای خراسان با تنوع اقلیمی و فرهنگی یک از ذخایر مهم در تنوع غذاهای تخمیری است. در این پژوهش پنیر سنتی قاینی با مصرف فراوان در جنوب خراسان برای جداسازی جدایه های با توانمندی پروبیوتیکی مورد توجه قرار گرفته است. توانمندی میکروارگانیسمهای به دست آمده از نظر ویژگیهای متعدد لازم برای یک سویه پروبیوتیک ارزیابی شده است.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه: پنیر قاینی از مناطق روستایی شهرستان قاین در استان خراسان جنوبی جمع آوری گردید. نمونه پنیر در ظروف استریل و سرما به آزمایشگاه منتقل شده و در کمتر از ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی باکتریها: نمونه پنیر جمع آوری شده به میزان یک گرم در ۹ میلی لیتر آب نمک استریل ۱ درصد یکنواخت و با استفاده از آب نمک ۱ درصد سری رقت تا رقت 10^{-5} تهیه و در محیطهای کشت نوترینت آگار و ام آر اس با درصد نمکهای صفر، ۳ و ۱۰ و با pH ۶/۵ و ۷/۵ تلقیح گردید. از آنتی بیوتیک سیکلوگزامید (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) جهت جلوگیری از رشد قارچها در محیط جداسازی استفاده شد. پلیتها به مدت حداکثر یک ماه در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پلیتها روزانه مورد بررسی قرار گرفته و ضمن شمارش تعداد کلنیها، جدایه های به دست آمده به محیط جدید منتقل و تا به دست آوردن کشت خالص عمل کشت تکرار گردید. جدایه های به دست آمده در محیط کشت شیب دار نوترینت آگار در ۴ درجه سانتی گراد برای کوتاه مدت و محیط مایع نوترینت برات به همراه ۳۰ درصد گلیسرول در ۸۰- درجه سانتی گراد جهت زمان طولانی نگهداری شدند.

ارزیابی توانمندی پروبیوتیکی جدایه ها: برای تعیین خصوصیات پروبیوتیکی، جدایه های متفاوت بر اساس

شرایط اسیدی و نمک صفرآوری داشته باشد. (۳) باید قادر به اتصال به سلولهای جدار روده باشد. (۴) باید توانایی مهار رشد باکتریهای بیماری زای گوارشی را دارا باشد. (۵) باید مقاومت آنتی بیوتیکی بالا نداشته باشد (۸). امروزه باکتریهای مختلفی با دارا بودن ویژگیهای فوق به عنوان انواع واجد توانمندی پروبیوتیکی شناسایی شده اند. اعضای جنس های *Bifidobacteria*، *Lactobacillus*، *Enterococcus*، *Pediococcus* و همچنین مخمر *Saccharomyces boulardii* به عنوان میکروارگانیسمهایی با توانمندی پروبیوتیکی شناخته می شوند (۲۰). پروبیوتیکها از منابع مختلف مانند دستگاه گوارش انسان، غذا های تخمیری لبنی، غذاهای تخمیری غیر لبنی و انواع آب میوه ها قابل جداسازی هستند (۲۰). یکی از منابع مهم برای جداسازی میکروارگانیسمهایی با خواص پروبیوتیک غذاهای تخمیری است. تخمیر، یکی از روشهای بیوتکنولوژی قدیمی برای تولید محصولات غذایی با خصوصیات بهتر مانند ماندگاری بالا و طعم مطلوب است. حاصل نهایی تخمیر معمولاً دارای جمعیت میکروبی بهبود یافته، ایمن و با مواد مغذی غنی شده است که می تواند در دمای محیط نگهداری گردد. از میان غذاهای تخمیری محصولات لبنی منبع مهمی برای به دست آوردن میکروارگانیسمهای پروبیوتیک است.

بیشتر مطالعات در شناسایی سویه های پروبیوتیک به باکتریهای جنس لاکتوباسیلوس متمرکز شده است (۸). با این وجود توانمندی پروبیوتیکی جنس های دیگر مانند انتروکوکها به خوبی مشخص شده است. انتروکوکها باکتریهای کروی گرم مثبت در گروه باکتریهای اسید لاکتیک بوده و در تخمیر مواد غذایی نقش مهمی دارند. نقش آنها در رسیدن و ایجاد ترکیبات معطر در پنیر و سوسیس های تخمیری نشان داده شده است (۱۸). در رابطه با جداسازی سویه های با توانمندی پروبیوتیکی از پنیر های تولید شده با روشهای سنتی در ایتالیا (۷)، آرژانتین (۲۲) و بلغارستان (۱۱) گزارشهای متعددی

سیلین (۱۰) بر روی محیط کشت قرار گرفت و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با استفاده از جدول استاندارد مؤسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی و تعیین قطر هاله عدم رشد، جدایه ها به حساس، نیمه حساس و مقاوم طبقه بندی شده اند (۶).

فعالیت ضد میکروبی: برای ارزیابی توانایی مهار رشد باکتریهای بیماری زا توسط جدایه ها از روش کشت تقاطعی استفاده شد (۴). به این منظور ابتدا جدایه های پروبیوتیک در محیط مولر هیتون آگار به صورت خطی کشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس باکتریهای بیماری زای مورد استفاده شامل *Escherichia coli* PTCC1399، *Staphylococcus aureus* PTCC1665، *Bacillus cereus* PTCC1431، *Bacillus subtilis* PTCC1365 و *Pseudomonas aeruginosa* PTCC1047 و *Klebsiella* (سویه بیمارستانی) به صورت عمود بر خط رشد جدایه های پروبیوتیک کشت و پلتهای به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نتایج بر اساس ایجاد هاله عدم رشد سویه های بیماری زا ثبت گردید.

ارزیابی خودتجمعی: از کشت مایع ۲۴ ساعته هر جدایه در محیط نوترینت برات، ۵ میلی لیتر به لوله آزمایش منتقل و به خوبی مخلوط شد. بلافاصله جذب نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت و سپس این لوله ها به مدت سه ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان جذب محلول رویی مجدداً در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. قدرت خود تجمعی با استفاده از رابطه زیر محاسبه و جدایه های با نتیجه بالای ۱۰ درصد به عنوان جدایه های دارای قدرت خودتجمعی در نظر گرفته شدند (۳).

$$\left(1 - \frac{X_2}{X_1}\right) \times 100 = \text{خود تجمعی } (\%)$$

مورفولوژی، رنگ و شکل کلنی انتخاب و آزمونهای زیر برای این جدایه ها انجام گرفت.

مقاومت به اسید: از غلظت معادل نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) واحد ایجاد کننده کلنی در هر میلی لیتر) کشت شبانه جدایه ها به میزان ۱ درصد به بافر فسفات نمکی (۲/۵ pH=) تلقیح و به مدت ۲ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه ها بر روی محیط نوترینت آگار تلقیح و بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری تعداد کلنیها شمارش شد. درصد زنده مانی براساس رابطه زیر تعیین گردید (۲۳):

$$(\%) \text{ میزان زنده مانی} = \frac{\log A_t}{\log A_0} \times 100$$

A_0 ، تعداد کلنیهای اولیه در زمان صفر و A_t ، تعداد کلنی بعد از ۲ ساعت تیمار در شرایط اسیدی است.

مقاومت به نمک صفر: از کشت مایع ۲۴ ساعته جدایه ها به میزان ۵ درصد به دو محیط مایع نوترینت برات حاوی ۰/۳ درصد نمک صفر و محیط شاهد بدون صفر تلقیح شد. محیط کشت درون گرمخانه ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت و در فواصل یک ساعته رشد جدایه ها با اندازه گیری جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر مشخص شد. زمان رسیدن به جذب ۰/۳ واحد در هر دو نمونه شاهد و تیمار تعیین و اختلاف زمان بر اساس دقیقه بین دو محیط برای رسیدن به این جذب تعیین شد. جدایه هایی با اختلاف زمانی کمتر از ۶۰ دقیقه به عنوان انواع مقاوم به صفر گزارش شدند (۱۶).

تست حساسیت به آنتی بیوتیک: به منظور ارزیابی حساسیت جدایه های منتخب به آنتی بیوتیکها از آزمون آنتی بیوگرام استفاده شد. غلظت معادل نیم مک فارلند جدایه ها بر روی محیط مولر هیتون آگار کشت و دیسک آنتی بیوتیکهای مورد استفاده شامل (میکروگرم بر دیسک): اریترومايسين (۱۵)، تتراسایکلین «۳۰»، ریفاپیسین (۵)، متی سیلین (۵)، کانامایسین «۳۰»، کلرامفنیکل «۳۰» و آمپی

خوبی ورتکس شدند و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. بعد از گذشت این مدت جذب هر نمونه در ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. با استفاده از رابطه زیر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی هر جدایه مشخص گردید (۳).

$$\text{فعالیت آنتی اکسیدانی (\%)} = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{rest}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

شناسایی جدایه‌ها: شناسایی جدایه‌های منتخب با روش مولکولی انجام شد. استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها، از کشت تازه و خالص با استفاده از کیت تجاری (سیناژن) و طبق دستور العمل آن انجام شد. شناسایی باکتریها، با تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA با آغازگرهای عمومی 27F و 1492R انجام گردید (۱۴). محصول تکثیر DNA جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردید. قرابت فیلوژنتیکی جدایه‌های به دست آمده با یکدیگر و با سویه‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه پتانسیل پروبیوتیکی باکتریهای به دست آمده از پنیر قاینی ارزیابی گردیده است. پنیر قاینی متعلق به استان خراسان جنوبی بوده که برای تهیه آن از شیر تازه گوسفند و گاو استفاده می‌شود و دوره رسیدگی پنیر درون مشک می‌باشد. ۹۶ جدایه با تلقیح نمونه پنیر بر روی محیطهای کشت مورد استفاده به دست آمد. از این تعداد ۵۹ جدایه میله‌ای شکل و ۳۷ جدایه کروی و تمامی آنها گرم مثبت بودند. تعداد ۳۰ جدایه متفاوت براساس صفاتی مانند شکل میکروسکوپی؛ شکل، رنگ و فرم کلنی؛ کاتالاز و اکسیداز برای مرحله تعیین ویژگیهای پروبیوتیکی انتخاب شدند.

مقاومت به اسید و صفرا: از میان ۳۰ جدایه مورد بررسی ۶ جدایه 630E، 1430BM، 7C37، 1337C، 2737C و 230D قادر به بقاء در شرایط اسیدی با توان متفاوت

در معادله فوق، X_1 جذب اولیه و X_2 جذب بعد از گذشت سه ساعت است.

فعالیت آب‌گریزی سطحی: ابتدا از هر جدایه کشت ۲۴ ساعته در محیط مایع نوتریت برات تهیه و سپس با استفاده از سانتریفیوژ، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۶۰۰۰ در دقیقه و در طی زمان ۱۰ دقیقه، سلولهای باکتری جدا شد. رسوب به دست آمده دو بار با محلول بافر نمکی فسفات در pH خنثی شستشو شد. رسوب باکتری در محلول نترات پتاسیم ۰/۱ مولار حل و سوسپانسیون میکروبی با جذب ۰/۲ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه گردید. پس از آن سوسپانسیون به دست آمده با نسبت ۱:۱ با کلروفرم مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت تا محلول دو فاز به دست آمد. جذب فاز آبی بعد از گذشت این زمان ثبت گردید. میزان آب‌گریزی بر اساس رابطه زیر تعیین و جدایه‌هایی با فعالیت آب‌گریزی بالای ۵۰ درصد به عنوان جدایه‌های با ویژگی آب‌گریزی سطحی انتخاب شدند (۱۹).

$$\text{درصد آب‌گریزی} = 1 - \left(\frac{X_2}{X_1} \right) \times 100$$

در این معادله، X_1 جذب سوسپانسیون باکتری در پتاسیم نترات و X_2 ، جذب محلول بعد از مخلوط شدن و ایجاد دو فاز آلی-آبی است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی: کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در محیط مایع نوتریت برات تهیه و به منظور به دست آوردن عصاره سلولی، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در حمام سونیکاتور قرار گرفت. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری شد. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدان از دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل استفاده شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول دی‌فنیل (۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول) به ۱۰۰ میکرولیتر مایع به دست آمده از سانتریفیوژ اضافه شد. به عنوان کنترل از ۲ میلی‌لیتر محلول دی‌فنیل حل شده در ۲ میلی‌لیتر متانول استفاده شد. لوله‌ها به

بودند (جدول ۱). جدایه 7C37 با ۸۸ درصد بقاء پس از ۲ ساعت تیمار در شرایط اسیدی (pH = ۲/۵) مقاوم‌ترین و جدایه 1430BM با ۶۹ درصد حساس‌ترین جدایه بوده است. شش جدایه تحمل‌کننده شرایط اسیدی مقاومت

جدول ۱- اثر اسید (pH ۲/۵) و نمک صفرا (۰/۳ درصد وزنی حجمی) بر رشد و زنده ماندن جدایه‌ها

جدایه	لگاریم تعداد اولیه	لگاریم تعداد بعد از تیمار اسیدی	نرخ بقا (%)	تأخیر رشد نسبت به شاهد (دقیقه)	صفرا
630E	۵/۴۸±۰/۹	۴/۸۳±۱/۲	۸۸	>۶۰	
2737C	۶/۶۲±۰/۳	۵/۵۰±۱/۳	۸۳	۵۰±۳/۰	
230D	۶/۹۲±۰/۳	۵/۵۸±۰/۳	۸۰	۵۵±۲/۵	
1337C	۶/۶۵±۰/۷	۴/۴۸±۰/۳	۷۱	۵۸±۱/۵	
1430BM	۴/۷۸±۰/۴	۳/۳۰±۰/۹	۶۹	۱۲±۰/۵	
7C37	۷/۲۵±۱/۱	۶/۳۸±۰/۹	۸۸	۴۰±۰/۵	

دیسک انتشاری برای ۵ جدایه انجام شد. بر اساس نتایج (جدول ۲)، اکثر جدایه‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های به کار برده شده دارای حساسیت بوده‌اند. تنها جدایه 2737C به کلرآمفنیکل نیمه حساس بوده است. در سویه‌های گزارش شده در این پژوهش مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی مشاهده نگردید که پتانسیل پروبیوتیکی مطلوب آنها را نشان می‌دهد.

جدایه 630E به دلیل اینکه بیش از ۶۰ دقیقه تأخیر رشد نشان داد به دلیل حساسیت به صفرا از ادامه مطالعات کنار گذاشته شد. از میان جدایه‌های به دست آمده، پنج جدایه قادر به تحمل صفرا و شرایط اسیدی برای آزمونهای بعد انتخاب شدند.

حساسیت به آنتی بیوتیک و فعالیت ضد میکروبی: آزمون حساسیت نسبت به ۷ آنتی بیوتیک با استفاده از روش

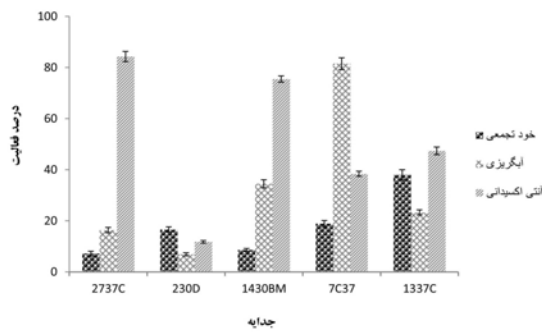
جدول ۲- حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک (میکروگرم بر دیسک)، قطر هاله عدم رشد بر اساس میلی متر: S: حساس، I: نیمه حساس، R: مقاوم

نام جدایه	اریترومایسین (۱۵)	تتراسایکلین (۳۰)	ریفامپسین (۵)	متی سیلین (۵)	کانامایسین (۳۰)	کلرامفنیکل (۳۰)	آمپی سیلین (۱۰)
2737C	S(۴۱±۲/۵)	S(۴۶±۲/۸)	S(۴۲±۱/۲)	S(۳۷±۳/۶)	S(۶۰±۳/۵)	I(۱۷±۱/۲)	S(۲۳±۱/۵)
230D	S(۳۷±۳/۴)	S(۵۰±۵/۲)	S(۲۶±۲/۴)	S(۵۷±۳/۵)	S(۳۶±۳/۱)	S(۴۵±۳/۹)	S(۳۹±۳/۹)
1337C	S(۲۰±۱/۵)	S(۲۱±۲/۰)	S(۴۰±۳/۵)	S(۲۲±۲/۳)	S(۳۵±۳/۵)	S(۳۷±۳/۳)	S(۲۷±۲/۵)
1430BM	S(۴۲±۳/۳)	S(۵۷±۴/۷)	S(۴۴±۳/۳)	S(۳۳±۳/۶)	S(۲۹±۱/۹)	S(۴۲±۳/۹)	S(۳۶±۳/۵)
7C37	S(۳۰±۲/۵)	S(۴۰±۳/۷)	S(۳۱±۲/۶)	S(۲۱±۲/۲)	S(۲۰±۱/۴)	S(۳۶±۴/۱)	S(۴۲±۲/۳)

دیده شد. با این وجود هیچ کدام از جدایه‌های مورد ارزیابی قادر به مهار رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* نبودند.

خودتجمعی، آب‌گریزی سطحی و آنتی اکسیدانی: نتایج قدرت خودتجمعی، آب‌گریزی سطحی و آنتی اکسیدانی

جدول ۳ اثرات ضد میکروبی جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش را نشان می‌دهد. به استثنای جدایه 1337C که قادر به مهار رشد هیچ یک از باکتری‌های بیماری‌زای به کار برده شده در این پژوهش نبود، سایر جدایه‌ها حداقل قادر به مهار رشد ۲ باکتری بیماری‌زا بودند. بیشترین اثر ضد میکروبی در جدایه 1430BM با توان مهار رشد ۵ باکتری



شکل ۱- آزمونهای خود تجمعی، آب‌گریزی سطحی و آنتی اکسیدانی در جدایه‌های پروبیوتیک

جدایه‌ها در شکل ۱ ارائه شده است. جدایه 7C37 با ۱۸/۹ و ۸۱/۵ درصد توان خود تجمعی و آب‌گریزی سطحی مطلوب‌ترین جدایه از نظر پتانسیل اتصال به سلولهای جدار روده است. جدایه 1430BM با وجود اینکه در سایر صفات بررسی شده توانمندی بالایی از خود بروز داده بود اما در ویژگی اتصال جزء جدایه‌های متوسط در نظر گرفته می‌شود. جدایه‌های مورد ارزیابی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی خوب (2737C و 1430BM)، متوسط (7C37 و 1337C) و ضعیف (230D) بوده‌اند.

جدول ۳- اثرات ضد میکروبی جدایه‌های پروبیوتیکی

نام جدایه	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
2737C	-	+	+	-	-	-
230D	+	-	+	-	-	-
1337C	-	-	-	-	-	-
1430BM	+	+	+	+	-	+
7C37	+	-	+	+	-	-

عنوان جدایه با بالاترین توانمندی پروبیوتیکی انتخاب و توسط روش مولکولی شناسایی گردید. بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16S rRNA، جدایه 7C37 متعلق به جنس *Enterococcus* با بیشترین شباهت به گونه *Enterococcus faecium* (۹۹ درصد تشابه) بود. تمام داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. معنی دار بودن نتایج (با ۹۵ درصد اطمینان) با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شد.

جهت انتخاب جدایه با پتانسیل پروبیوتیکی برتر از میان پنج جدایه مورد ارزیابی، برای هر یک از هفت ویژگی پروبیوتیکی بررسی شده، جدایه‌ها به سه گروه خوب (گروه با بالاترین توانمندی در میان جدایه‌های مورد بررسی، ۳ امتیاز)، متوسط (گروه با توانمندی متوسط در میان جدایه‌های مورد بررسی، ۲ امتیاز) و ضعیف (گروه با توانمندی پایین در میان جدایه‌های مورد بررسی، ۱ امتیاز) تقسیم بندی شدند (جدول ۴). بر اساس نتایج حاصل از مجموع صفات پروبیوتیکی جدایه 7C37 به

جدول ۴- امتیاز دهی به سویه‌ها بر اساس نتایج آنالیزهای مختلف. خوب ۳ امتیاز، متوسط ۲ امتیاز، ضعیف ۱ امتیاز (سویه برتر به صورت پررنگ نشان داده شده است).

نام جدایه	pH	صفرا	مقاومت به آنتی بیوتیک	ضد میکروبی	خود تجمعی	آب‌گریزی	آنتی اکسیدانی	مجموع امتیاز
2737C	۳	۱	۱	۲	۲	۱	۳	۱۳
230D	۳	۱	۳	۲	۲	۱	۱	۱۳
1337D	۲	۱	۳	۱	۳	۲	۲	۱۴
1430BM	۱	۳	۳	۳	۱	۲	۳	۱۶
7C37	۳	۲	۲	۳	۲	۳	۲	۱۷

بحث و نتیجه‌گیری

مقاومت در این جدایه‌ها ویژگی مطلوبی برای توانمندی پروبیوتیک آنهاست. از دیگر صفات لازم برای پروبیوتیکها توانایی مهار رشد باکتریهای بیماری‌زاست. پیدایش سریع سویه‌های بیماری‌زای مقاوم و سمیت مزمن مواد ضد میکروبی شیمیایی به دنبال استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیکها، دانشمندان را ترغیب به پیدا کردن ابزارهایی ایمن در درمان عفونتهای باکتریایی کرده است. استفاده از باکتریهای پروبیوتیک برای حل این مشکل گزینه مناسبی است. یک پروبیوتیک مفید باید فعالیت ضد میکروبی بر علیه بیماری‌زاهای موجود در سیستم گوارش داشته باشد. جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش تنها بر علیه باکتری *Pseudomonas* اثری نداشتند که با توجه به عدم حضور این باکتری در دستگاه گوارش محدودیت برای یک سویه پروبیوتیک نمی‌باشد.

جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش از نظر صفات لازم برای اتصال و کلونیزه شدن در دستگاه گوارش نیز دارای توانمندی قابل توجهی بودند. تجمع، یک فرآیند برگشت پذیر انباشت سلول است که باعث می‌شود سلولهای موجود در محیط به طور خود به خودی رسوب کنند. قدرت خود تجمعی و آب‌گریزی سطحی در باکتریهای پروبیوتیک برای اتصال به سلولهای جدار روده مهم و منجر به کلونیزاسیون باکتری و افزایش حضور در دستگاه گوارش می‌شود (۱۵). فعالیت آنتی‌اکسیدانی از دیگر صفات مشاهده شده در جدایه‌های به دست آمده از پنیر قاینی بوده است. رادیکالهای آزاد، با دارا بودن الکترونها جفت نشده مولکولهایی بسیار ناپایدار هستند که به دلایل مختلف در بدن ایجاد می‌گردند. این ترکیبات اکسیدکننده به دنبال واکنش با سایر ماکرومولکولها موجب آسیب‌گشای سلول، آنزیمها و DNA می‌شوند. گاهی نتیجه این آسیب، ایجاد بیماریهای خطرناکی مانند سرطان و بیماریهای قلبی خواهد بود (۵). آنتی‌اکسیدانها ترکیبات شیمیایی هستند که از ایجاد آسیبهای اکسیداتیو جلوگیری کرده و یا آن را کاهش می‌دهد و برای حفظ سلامتی انسان

در این مطالعه جدایه‌های باکتری به دست آمده از پنیر سنتی قاینی به عنوان یک فراورده تخمیری لبنی در خراسان جنوبی جهت بررسی توانمندی پروبیوتیکی آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به اینکه بیشتر مطالعات در جداسازی سویه‌های پروبیوتیک بر اعضای جنس لاکتوباسیلوس متمرکز شده است در این پژوهش به منظور امکان ارزیابی توانمندی پروبیوتیکی سایر سویه‌های موجود، شرایط معمول جداسازی لاکتوباسیلها مانند رشد در شرایط بی‌هوایی استفاده نگردید. از ویژگیهای لازم برای یک پروبیوتیک توانایی بقاء در شرایط دستگاه گوارش با مقاومت به اسید و صفراست. همچنین تحمل اسید امکان استفاده و بقای این سویه‌ها در محصولات غذایی اسیدی مانند ماست را بدون کاهش قابل توجه جمعیت باکتری فراهم می‌کند (۲۱). جدایه انتروکوکوس به دست آمده در این پژوهش مقاومت بالاتری نسبت به اسید و صفرا در مقایسه با برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس (۱) داشته است. پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سویه‌های پروبیوتیک را نیز مصون نگذاشته است. میزان شیوع مقاومت به آنتی‌بیوتیکها در پروبیوتیکها با منطقه جداسازی آنها مرتبط می‌باشد. در پژوهشی روی سویه‌های پروبیوتیکی جدا شده از غذا‌های سنتی یک ناحیه روستایی، مقاومت به آنتی‌بیوتیکها مشاهده نگردید که دلیل آن به کارگیری درمانهای سنتی به جای آنتی‌بیوتیکها در منطقه مورد نظریان شده است (۱۳). با این وجود در سایر پژوهشها مقاومت به آنتی‌بیوتیکهایی مانند استرپتومایسین در باکتریهای *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* گزارش شده است (۲۴). به هر روی عدم وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های پروبیوتیکی ضروری می‌باشد. در جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش مقاومت بسیار اندکی نسبت به آنتی‌بیوتیکها (تنها یک جدایه نسبت به یک آنتی‌بیوتیک) مشاهده گردید. عدم شیوع ژنهای

به عنوان پروبیوتیک تا کنون گزارشی از بیماری‌ها از بودن این سویه‌ها منتشر نشده است. برخی محققین امکان انتقال افقی ژنهای بیماری‌زا به سویه‌های پروبیوتیک را مطرح می‌کنند. به هر حال این امکان در مورد سایر پروبیوتیک نیز قابل بیان است و همین‌طور دریافت یک ژن الزاماً به معنی تبدیل یک سویه به نوع بیماری‌زا نخواهد بود.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی در این پژوهش جدایه *Enterococcus sp. 7C37* با توانمندی پروبیوتیکی بالا از یک پنیر محلی در استان خراسان جدا گردید. این جدایه متعلق به گونه *Enterococcus faecium* می‌باشد که در مقایسه با گونه *Enterococcus faecalis* ایمنی بیشتری دارد. مطالعات تکمیلی جهت بررسیها در کشت سلولی و مدل حیوانی جهت ارزیابی اثرات مطلوب این جدایه و همین‌طور توجه به نکات مورد نظر در استفاده با احتیاط *Enterococcus* ها برای به کارگیری آن ضروری است.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (۳/۳۳۶۲۴) انجام شده است.

بسیار مهم می‌باشند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در برخی باکتریهای اسید لاکتیک گزارش شده و از صفات مطلوب در یک باکتری پروبیوتیک است (۲ و ۱۲).

بر اساس نتایج حاصل از مجموع صفات ارزیابی شده، باکتری 7C37 متعلق به جنس *Enterococcus* به عنوان کاراترین جدایه پیشنهاد گردید. جنس *Enterococcus* متعلق به گروه باکتریهای اسید لاکتیک است. اعضای این جنس در تخمیر مواد غذایی نقش مهمی دارند مانند نقش آنها در رسیدن پنیر و تولید ترکیبات معطر در آن و یا نقشی که آنها در برخی سوسیسها تخمیری دارند. به واسطه توانایی بالا در تحمل pH و نمک اعضای این جنس در طیف گسترده‌ای از غذاهای تخمیری یافت شده است. با وجود اینکه اعضای جنس انتروکوکوس به عنوان پروبیوتیکهای توانمند شناسایی شده اند امروزه برخی در مورد کار برد آنها رعایت احتیاط را ضروری می‌دانند. برخی از انواع این جنس در ایجاد عفونتهای بیمارستانی مانند اندوکاردیت، عفونت ادراری، و باکتریی نقش دارند. ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیکها، ژنهای اتصال و تهاجم و همولیزین از دلایل بیماری‌زا بودن این سویه‌هاست. با این وجود با گذشت بیش از بیست سال از مصرف انتروکوکها

منابع

- ۱- ساجدی نژاد، ندا، شرفی، حکیمه، پاک نژاد، مژگان، سلیمانی، شایسته، یدالله، هوشمند، بهزاد، مدیری، سیما، شهبانی ظهیری، حسین، اکبری نوقابی، کامبیز. (1394). بررسی خاصیت ضد باکتریایی و پروبیوتیکی یک سویه لاکتوباسیلوس سالیواریوس ۰۲ NK جدا شده از دهان بر روی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* باکتری شایع در بیماران با التهاب لثه. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۸۴-۷۶ (۱): ۸
- ۲- غلامپور فاروجی، نازنین، حداد مشهدریزه، علی اکبر، دولت آبادی، سمانه. (۱۳۹۵). بررسی زیست‌داده‌ای ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنزیم‌های باکتریایی موثر در مقاومت به استرس‌های اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۴۲۳-۴۰۹ (۴): ۲۹
- 3- Archer AC, Halami PM, 2015, Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. Applied and Microbiology and Biotechnology, 99, 19, 813-823.
- 4- Balouiri M, Sadiki M, Koraichi Ibsouda S, 2016, Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6, 2, 71-79.
- 5- Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H, 1999, Oxidative injury and challenge of antioxidants to free radicals and reactive oxygen species. Critical Review in Oral Biology, 10, 4, 458-476.
- 6- CLSI, 2007, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.

- 7- De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo MR, Gobbetti M, 2001, Characterization of Non-Starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5, 2011–2020.
- 8- Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H, 2017, *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1490, 1-15.
- 9- FAO/WHO, 2002, Guidelines for the evaluation of probiotic in food. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotic2/en/pp 1–11.
- 10- Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A, 2013, Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 2, 35-50.
- 11- Georgieva RN, Iliev IN, Chipeva VA, Dimitonova SP, Samelis J, Danova ST, 2008, Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *Journal of Basic Microbiology*, 48, 4, 234–244.
- 12- Keunho Ji, Jang NY, Kim YT, 2015, Isolation of Lactic Acid Bacteria Showing Antioxidative and Probiotic Activities from Kimchi and Infant Feces. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 9, 1568-1577.
- 13- Khanghah SM, Ganbarov K, 2014, *Lactobacillus* with probiotic potential from homemade cheese in Azerbaijan. *Bioimpacts*, 4, 1, 49–52.
- 14- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR, 1985, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 20, 6955–6959.
- 15- Potočnjak M, Pušić P, Frece J, Abram M, Janković T, Gobin I, 2017, Three New *Lactobacillus plantarum* Strains in the Probiotic Toolbox against Gut Pathogen *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. *Food Technology and Biotechnology*, 55, 1, 48–54.
- 16- Ramos CL, Thorsen L, Schwan RF, Jespersen L, 2013, Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36, 1, 22–29.
- 17- Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC, 2017, Microbes and mental health: A review. *Brain Behavior Immunity*, 66, 11, 9-17.
- 18- Santos KMO, Vieira ADS, Salles HO, Oliveira JdS, Rocha CRC, Borges MdF, et al, 2015, Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. *Brazilian Journal of Microbiology* 46, 1, 237-249.
- 19- Silva dias F, Ferreira Duarte W, Freitas Schwan R, 2013, Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Bioscience Journal*, 29, 1, 1678- 1686.
- 20- Sornplang P, Piyadeatsoontorn S, 2016, Probiotic isolates from unconventional sources: a review. *Journal of Animal Science and Technology*, 58, 26, 1-11.
- 21- Vergin F, 1954, Anti- und Probiotika (Anti- and probiotics). *Hippokrates*, 25,4, 116 – 119.
- 22- Vinderola CG, Prosello W, Ghiberto D, Reinheimer JA, 2000, Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 9, 1905–1911.
- 23- Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT, 2010, Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. *Anaerobe Journal*, 16, 6, 578- 585.
- 24- Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS, 2005, Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 98, 2, 211-217.

Isolation of *Enterococcus* sp. 7C37 with high probiotic potentials from Qaeni cheese, a diary fermented product in South Khorasan

Talebi S., Makhdoumi A. and Bahreini M.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

Abstract

Probiotics are live microorganisms with helpful effects on digestive system of human and animals. Isolation of novel bacteria with probiotic potentials from less investigated sources, expand the application of these microorganisms in human and animals health. Isolation and exploring the probiotic potentials of resident bacteria from a native cheese in south khorasan was the aim of the current study. In order to isolating the bacteria from Qaeni cheese, samples were inoculated on NA and MRS culture media after prepared suitable dilution. In order to assay their probiotic activity characteristics including acid and bile resistance, antibiotic susceptibility, antimicrobial activity, hydrophobicity, self-aggregation and anti-oxidant activity were analyzed among the selected strains. A total of 90 isolates were obtained in this study. Of them 30 isolates were selected as different ones base on colony pigmentation, microscopic morphology and Gram staining. A total of 5 isolated could survive in acidic and presence of bile conditions and selected for further analysis. All of the strains were susceptible to erythromycin, tetracycline, methicillin and chloramphenicol, rifampicin and ampicillin. Only one isolate was resistant to chloramphenicol. The most antibacterial activity was observed against *E. coli* and *B. subtilis*. Based on the results from all probiotic traits, strain 7C37 which belonged to the genus *Enterococcus* represent the highest probiotic potential. The novel strains from indigenous fermented cheese are good candidate for complementary analysis for selection as probiotic bacteria.

Key words: *Enterococcus*, Qaeni chesse, Fermented food, Probiotic