NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.13/51 , 2023

Scan online to view this article

Screening of lactic acid bacteria as suitable human probiotics isolated from Azerbaijan dairy products

Manizheh Hajizadeh Varzeghan[1], Gholamreza Zarrini[2*], Farzam Sheikhzadeh Hesari[2], Mohammad Hossein Modarressi[3]

1. Department of Biology Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran
2.Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz-Iran
3. Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Tehran University of Medicine Science, Tehran- Iran

Abstract

Aim and Background: Among functional foodstuffs, the use of probiotics is rapidly increasing now. Probiotics are defined as living microorganisms that are beneficial to a person when consumed in sufficient quantities. Among probiotics, lactic acid bacteria are the most popular. Given the high number of probiotic bacteria in the gut, probiotics seem to be one of the most interesting candidates for the treatment of the Inflammatory bowel disease (IBD). Probiotics strengthen Paneth and Goblet cells in the gut by enlarging the mucosa. They also modulate the gut microbiota by maintaining balance and suppressing the growth of potentially pathogenic bacteria in the gut. This research aimed was to isolate and identify new isolates of lactic acid bacteria from the traditional dairy products of the region of Azerbaijan (Varzeqan), with appropriate human probiotic ability.

Material and Methods: In this study, lactic acid bacteria in dairy products of the Varzeqan region of East Azerbaijan were isolated and characterized by biochemical and molecular methods and their probiotic ability was evaluated. The isolates were then selected using morphological characteristics, gram staining, catalase test, growth test at 15, 37, and 40 ° C, fermentation ability in different sugars, acid resistance, bile salts, arginine hydrolysis. *16S rRNA* gene sequencing was used for molecular characterization.

Results: In this study, 104 isolates of dairy samples were purified and evaluated for probiotic properties of Lactobacillus, Lactococcus and Enterococcus. By examining the probiotic properties in these isolates, 13 isolates showed good probiotic capability.

Conclusions: According to the results, Lactobacilli isolates had a good ability to be probiotic in terms of acid tolerance and bile salts and could have sufficient survival for use in the gastrointestinal tract. The results showed the traditional dairy products of the region of Azerbaijan have a desirable potential to isolation of suitable human probiotics.

Key words: Probiotic, *Lactobacillus*, *Enterococcus,* traditional dairy product,Iau Science

Corresponding author:
Department of Animal Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Tabriz-Iran
Email: zarrini@tabrizu.ac.ir

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۳ - شماره۵۱ - تابستان ۱۴۰۲
NCMBJ
مقاله پژوهشی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

غربال گری لاکتیک اسید باکتری ها به عنوان پروبیوتیک‌های مناسب انسانی از محصولات لبنی آذربایجان

منیژه حاجی زاده ورزقان[1]، غلامرضا زرینی[2*]، فرزام شیخ زاده حصاری[2]، محمد حسین مدرسی[3]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده:

سابقه و هدف: در میان مواد غذایی کاربردی، استفاده از پروبیوتیک‌ها به سرعت در حال افزایش است. پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده‌ای تعریف می‌شوند که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند، برای فرد سودمند هستند. پروبیوتیک‌ها می‌توانند باکتری، مخمر یا کپک باشند؛ اما اکثر آن‌ها باکتری هستند. در میان باکتری‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک محبوب‌تر بوده و اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به این گروه می‌باشند. در میان باکتری‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک محبوب‌تر بوده و اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به این گروه می‌باشند. با توجه به تعداد بالای باکتری‌های پروبیوتیک در روده، به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها یکی از جالب‌ترین نامزدها برای درمان بیماری التهابی روده[1] (IBD) باشند. پروبیوتیک‌ها با افزایش مخاط، سلول‌های Paneth و Goblet روده را تقویت می‌کنند. هم‌چنین پروبیوتیک‌ها باعث تعدیل میکروبیوتای روده با حفظ تعادل و سرکوب رشد باکتری‌های بیماری‌زای احتمالی در روده می‌شود. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی جدایه‌های جدید لاکتیک اسید باکتری، از لبنیات سنتی رایج منطقه‌ی آذربایجان (ورزقان)، با قابلیت پروبیوتیکی انسانی مناسب انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر لاکتیک اسید باکتری‌های موجود در محصولات لبنی منطقه ورزقان از آذربایجان شرقی با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شده و توانایی پروبیوتیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. سپس جدایه‌ها با استفاده از خصوصیات ظاهری، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون رشد در دماهای ۱۵، ۳۷ و ۴۰ درجه سلسیوس، توانایی تخمیر در قندهای مختلف از بین جدایه‌های جداسازی شده روی محیط کشت اختصاصی MRS، انتخاب شده و خواص پروبیوتیکی آن‌ها بررسی شدند. مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی، هیدرولیز آرژنین بررسی شدند. برای شناسایی مولکولی از توالی‌یابی ژن *16 S rRNA* استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه ۱۰۴ جدایه از نمونه های لبنی خالص سازی و برای خصوصیات پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفت که از لاکتوباسیلوس ها، لاکتوکوکوس‌ها و انتروکوکوس‌ها بودند. با بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی در این جدایه‌ها تعداد ۱۳ جدایه قابلیت پروبیوتیکی مناسبی از خود نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده جدایه‌های لاکتوباسیلی توان مناسبی برای پروبیوتیک بودن از نظر تحمل اسید و املاح صفراوی داشتند و می‌توانستند برای کاربرد در دستگاه گوارش بقا کافی داشته باشند. فرآورده‌های لبنی سنتی منطقه آذربایجان دارای استعداد مطلوبی برای جداسازی پروبیوتیک‌های مناسب انسانی هستند.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، *Lactobacillus*، *Enterococcus*، فراورده لبنی سنتی، Iau Science

نویسنده مسئول:
گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
پست الکترونیکی: zarrini@tabrizu.ac.ir
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

مقدمه

امروزه بسیاری از جنبه‌های رژیم غذایی و محصولات طبیعی، توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند. یکی از این موارد «پروبیوتیک‌ها[2]» هستند (۱). در میان مواد غذایی کاربردی، استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌سرعت در حال گسترش است (۲). طبق تعریف FAO/WHO[3]، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده هستند، که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند، برای افراد سودمند هستند (۳،۴). واژه پروبیوتیک از دو کلمه‌ی یونانی« پرو » «بیوتیک» به معنی (برای حیات) منشأ گرفته است. پروبیوتیک‌ها با حفظ یا بهبود تعادل میکروبی روده می‌توانند اثرات سلامت بخشی برای میزبان خود به همراه داشته باشند. پروبیوتیک‌ها، در قالب غذاهای لبنی حاوی لاکتیک اسید باکتری‌ها، برای قرن‌ها توسط انسان مصرف‌شده‌اند (۵). مصرف مکمل‌های پروبیوتیک موجب ایجاد کلنی‌های مفیدی می‌شوند که می‌توانند مانند محیط باکتریایی طبیعی روده به‌سلامتی انسان کمک کنند و درعین‌حال زمانی را فراهم آورند که محیط باکتریایی طبیعی روده، خود را ترمیم و بازسازی کند. از این رو پروبیوتیک‌ها را ترمیم‌کننده‌های زیستی می‌نامند. تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در لحظه مصرف به‌منظور اثربخشی آن‌ها بر میزبان بر اساس استاندارد کمیته بین‌المللی فرآورده‌های لبنی[4] (IDF) باید حداقل 10^7 CFU در هر گرم یا میلی‌لیتر فرآورده باشد. (۶) پروبیوتیک‌ها می‌توانند از انواع باکتری، کپک یا مخمر باشند؛ اما بیشتر پروبیوتیک‌ها باکتری هستند (۲). مکانیسم‌های عمل پروبیوتیک‌ها شامل: تولید ترکیبات مهارکننده، رقابت برای جایگاه‌های اتصال، رقابت برای مواد غذایی، از بین بردن رسپتورهای سموم و تقویت سیستم ایمنی است. ارگانیسم‌هایی که به عنوان پروبیوتیک‌ها محسوب می‌شود باید ساکنان طبیعی دستگاه گوارش باشند، باید توانایی بقا در قسمت بالایی دستگاه گوارش را داشته باشند (مقاومت به اسید)، باید قادر به زنده ماندن و رشد در روده باشند، باید اثرات مفید برای میزبان داشته باشند و باید تا قبل از مصرف، قابلیت زنده ماندن و فعالیت در مواد غذایی حامل خود را داشته باشند. همچنین این مسئله مهم است که این ارگانیسم‌ها باید غیر بیماری‌زا و غیر سمی باشند (۷،۸). تمام باکتری‌هایی که امروزه به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند، در دو دسته لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم جای می‌گیرند که به‌طور طبیعی جزئی از اکوسیستم دستگاه گوارش هستند و پروبیوتیک محسوب می‌شوند.

اهمیت خاصیت پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌ها

پروبیوتیک‌های ایده‌آل ویژگی‌های متعددی دارند از جمله مقاومت نسبت به اسید معده، املاح صفراوی، آنزیم‌های گوارشی و مراحل فرآوری و تولید، قابلیت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده، غیربیماریزا و غیر تهاجمی بودن، توانایی حفظ و پایدار ژنتیکی، توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا. هم‌چنین، آن‌ها جزئی از میکروفلورها بوده، در تنظیم پاسخ‌های ایمنی نقش دارند، قابلیت کلونیزه شدن در دستگاه گوارش انسان را دارا می‌باشند و مانع اتصال باکتری‌های پاتوژن به مخاط روده می‌شوند. لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل و کوکوباسیل می‌باشند. این باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور، کاتالاز، اکسیداز و ایندول منفی می‌باشند. این باکتری‌ها جزء فلور نرمال دهان، روده، دستگاه تناسلی زنان می‌باشند و هم‌چنین، در مواد لبنی، گوشت و سطح برگ گیاهان نیز یافت می‌شوند (۹).

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر لاکتیک اسید باکتری‌های موجود در محصولات لبنی منطقه ورزقان از آذربایجان شرقی با روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شده و توانایی پروبیوتیکی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. سپس جدایه‌ها با استفاده از خصوصیات ظاهری، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون رشد در دماهای ۱۵، ۳۷ و ۴۰ درجه سلسیوس، توانایی تخمیر در قندهای مختلف از بین جدایه‌ها جداسازی شده روی محیط کشت اختصاصی MRS، انتخاب شده و خواص پروبیوتیکی آن‌ها بررسی شدند. مقاومت به اسید، نمک‌های صفراوی، هیدرولیز آرژنین بررسی شدند. برای شناسایی مولکولی از توالی‌یابی ژن *16 SrRNA* استفاده شد.

جداسازی باکتری‌ها

به‌منظور جداسازی لاکتوباسیل ها از مواد لبنی سنتی، چندین نمونه از لبنیات سنتی منطقه آذربایجان که به‌طور

[2] probiotics
[3] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization
[4] International Dairy Federation

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

مرسوم از بیشترین نرخ مصرف در میان مردم برخوردار بودند، جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تبریز منتقل شد. سپس به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای کشت، توسط محلول سرم فیزیولوژی (۰٫۹٪ نمک NaCl) استریل، رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3}، از نمونه‌ها تهیه شد. به این صورت که برای تهیه در رقت 10^{-1}، از ماده لبنی جامد ۱ گرم و از ماده لبنی مایع ۱ میلی‌لیتر، در ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی توسط دستگاه ورتکس به‌طور کامل سوسپانس شد.

کشت سوسپانسیون میکروبی

محیط کشت اختصاصی برای رشد لاکتوباسیل ها، محیط MRS[5] اگار (جامد) و MSR برات (مایع) است. در این مرحله از کشت به دلیل نیاز به ظهور کلنی‌ها و بررسی مورفولوژی آن‌ها، از محیط جامد استفاده شد. پلیت های تلقیح شده، به مدت ۴۸ ساعت در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که به دلیل بی‌هوازی بودن لاکتوباسیل‌ها، همه کشت‌های باکتریایی قبل از انتقال به گرم‌خانه در داخل جار بی‌هوازی شمع قرار داده شدند. بررسی مورفولوژی کلنی‌ها، اولین قدم از شناسایی است. پس از ظهور کلنی‌ها، شکل و خصوصیات ظاهری آن‌ها زیر لوپ بررسی شد. پس از بررسی ماکروسکوپی کلنی‌ها، به‌منظور مشاهده و بررسی مورفولوژی باکتری‌های تشکیل‌دهنده‌ی کلنی، از رنگ آمیزی گرم استفاده شد. سپس لام تهیه شده زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور جداسازی اولیه، پس از شناسایی کلنی‌های باکتری‌های موردنظر، از این کلنی‌ها بر روی محیط کشت MRS اگار کشت خالص انجام گرفت. پس از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، خلوص کلونی‌های ظاهرشده توسط رنگ‌آمیزی گرم تأیید شد. به دلیل کاتالاز منفی بودن لاکتوباسیل‌ها، این تست یک تست تأییدی است. بدین منظور یک قطره H_2O_2 ۳٪ بر روی لام قرار گرفت و مقداری از کلنی خالص باکتری در آن سوسپانسیون شد. اگر آنزیم کاتالاز در باکتری وجود داشته باشد، حباب‌های گاز ظاهر می‌شود.

شناسایی اولیه باکتری‌ها تست‌های بیوشیمیائی

تست‌های لازم برای این سطح مطابق طبقه‌بندی کتاب "برجی" شامل تست VP[6]، تست هیدرولیز آرژنین، تست تخمیر کربوهیدرات‌ها، تست رشد در دماهای مختلف صورت گرفت.

شناسایی مولکولی براساس توالی *16S rRNA*

شناسایی بیوشیمیایی روش چندان دقیقی برا تشخیص گونه نیست، لذا برای شناسایی دقیق‌تر، از روش PCR استفاده شد. برای شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های برگزیده‌ی این پروژه، با تمرکز بر تکثیر و توالی یابی ژن *16S rRNA*، از روش PCR و بررسی نتایج با روش الکتروفورز ژل اگارز استفاده شد. از پرایمرهای عمومی زیر برای این PCR استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمرهای مورداستفاده در واکنش PCR

توالی	پرایمر
5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	27 F
5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'	1429R

[5] De Man, Rogosa and Sharpe

[6] Voges Proskauer Test

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

برای استخراج DNA الگو از روش لیز حرارتی یا جوشاندن استفاده شد و طبق برنامه دمایی خاص، عمل تکثیر انجام گرفت. برای بررسی اولیه محصولات PCR از الکتروفورز استفاده شد. در ادامه محصول توالی‌یابی شد و نتایج توسط نرم‌افزار BLAST با توالی‌های موجود در سایت NCBI مقایسه شد. با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7 برای هر یک از جدایه‌ها درخت فیلوژنتیکی بر اساس تشابه توالی جدایه ها با توالی‌های موجود در سایت NCBI رسم گردید.

انتخاب پروبیوتیک مناسب کشت برای تهیه ترکیبات موثر

محیط مناسب برای به دست آوردن متابولیت باکتریایی، محیط مایع است که در مورد لاکتوباسیل‌ها از محیط MRS براث استفاده شد. به‌منظور تهیه متابولیت، باکتری‌ها در فالکون های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط مایع تلقیح شده و کشت‌ها در گرم‌خانه‌ی شیک دار C ° ۳۷ گرماگذاری شدند.

آزمون مقاومت به اسید

محیط MRS براث تهیه کرده، سپس یک ارلن کوچک حاوی آب مقطر اتوکلاو کرده و با پیپت استریل از HCL غلیظ به آن (آب مقطر) اضافه شد. سپس اسید استیل با کمک سمپلر به محیط MRS اضافه شد و پس از همزدن کامل، قطره‌ای برداشته و با کاغذ PH متر حدود PH تعیین شد. پس از تایید PH محیط، ml ۱/۳ از محیط را در میکروتیوپ ml ۱/۵ ریخته و سپس میکروتیوپ تلقیح شد. بعد از کشت، تیوپ‌ها به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. سپس تیوپ‌ها را یکنواخت کرده (با همزن یا ورتکس) و از هر تیوپ µl ۱۰۰ برداشته و در لوله‌های حاوی ml ۹/۹ آب مقطر وارد شد و کامل همزده شد. در لوله‌های آب مقطر به جای پنبه از فویل استفاده شد. از هر لوله µl ۵۰ برداشته و روی پلیت MRS آگار با میله‌ی شیشه‌ای کشت داده شد و به مدت ۳۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد و سپس کلنی‌ها شمارش شد.

آزمون مقاومت به نمک صفراوی

محیط کشت MRS مایع به عنوان کنترل و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد املاح صفراوی به عنوان کشت مورد آزمایش (تیمار) به طور همزمان با یک درصد از کشت باکتریایی فعال ۲۴ ساعته تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. رشد در کشت‌های کنترل و تیمار، هر نیم ساعت یک بار با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری کنترل شد. برای محدود کردن جذب نوری به رشد باکتریایی، جذب نوری محیط‌های کنترل و تیمار در طول موج ۶۰۰ نانومتر با استفاده از MRS مایع و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد بایل بدون تلقیح باکتریایی، صفر شد.

بررسی اثرات ضد میکروبی باکتری‌ها

روش انتشار در حفره آگار به صورت گسترده برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های میکروبی و گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۱،۱۰). برای انتخاب لاکتیک اسید باکتری با فعالیت ضد میکروبی بالا، گونه‌های *اشریشیا کلی*[7]، *کلبسیلا پنومونیه*[8]، *باسیلوس سوبتیلیس*[9]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[10] و *کاندیدا کفیر*[11] مورد استفاده قرار گرفت. از سوسپانسیون باکتری که به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت مولر هینتون آگار رشد کرده بود، محلول نیم فارلند تهیه گردید و سپس با استفاده از سوآپ سر پنبه‌ای استریل به محیط کشت مولر هینتون آگار به طور یکنواخت تلقیح شدند. توسط بخش انتهایی پیپت پاستور، چاهک‌هایی با قطرهای مساوی ۶ میلی‌متری حفر و ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی آماده شده، داخل چاهک تلقیح شد. پلیت‌ها را برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانیگراد انکوبه گذاری و پس از گذشت این مدت زمان، قطر هاله‌ی عدم رشد اندازه‌گیری شد. جهت افزایش دقت و حساسیت، هر آزمون در سه تکرار انجام پذیرفت و میانگین قطر هاله عدم رشد ثبت گردید.

تعیین غلظت واحد

به دلیل لزوم یکسان بودن غلظت متابولیت‌ها در بررسی کشت سلولی برای محاسبات و حصول نتایج دقیق، میزان جذب نوری یا OD از طول موج ۶۰۰ نانومتر برای محاسبه‌ی غلظت متابولیت‌ها استفاده شد. از روی این مقدار، غلظت‌های مقادیر استفاده شده از متابولیت محاسبه گردید.

[7] Escherichia coli
[8] Klebsiella pneumonia
[9] Bacillus subtilis
[10] Staphylococcus aureus
[11] Candida kefyr

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

جداسازی سوپرناتانت

متابولیت‌های باکتریایی طی کشت یک‌شبه به محیط کشت آزاد می‌شوند. برای جداسازی این متابولیت‌ها، محیط موجود در فالکون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاوی متابولیت‌ها از رسوب باکتریایی جداشده و برای قابل استفاده بودن برای تست‌های کشت سلولی، توسط فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرونی استریل شد.

بررسی سمیت سلولی تست MTT

یکی از روش‌های سنجش میزان سمیت یک ترکیب شیمیایی یا هر ماده‌ی دیگر روی سلول، آزمون MTT است. MTT که یک نمک تترازولیوم[12] زردرنگ است، جذب میتوکندری سلول‌های فعال ازنظر متابولیک شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازان[13] بنفش‌رنگ می‌کند که در حلال مناسب حل‌شده و میزان رنگ تولیدشده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. جهت انجام تست MTT، سلول‌های HFF2 دقیقاً مطابق با روش انجام‌شده در بررسی میکروسکوپی کشت داده شدند، فقط با این تفاوت که برای هر سوپرناتانت باکتری، در پلیت ۹۶ خانه‌ای ۶ ردیف سلول کشت شد. سه ردیف برای زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و هر کدام با دو بار تکرار (۳ زمان در دو بار تکرار برابر با ۶ ردیف). پس از دو ساعت گرماگذاری، روز اول سلول‌های زمان ۷۲، روز دوم زمان ۴۸ و روز سوم زمان ۲۴ توسط دارو با همان میزان ذکرشده در تست قبلی تیمار شدند. محیط چاهک‌های کنترل هم در فواصل منظم تعویض شد. روز چهارم، ۲۰ میکرو لیتر محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر ۲ میلی‌لیتر PBS، به هر چاهک اضافه شد و پلیت کشت به مدت ۳ ساعت در گرم‌خانه قرار گرفت. پس از ۳ ساعت، مایع رویی پلیت های تخلیه و به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (حلال مناسب بلورهای فورمازان) اضافه شد و پیپتاژ صورت گرفت. برای اطمینان از حل شدن کامل، پلیت چند دقیقه بر روی شیکر قرار گرفت. پس از آن، میزان رنگ تولیدشده که نشان‌دهنده‌ی سلول‌های زنده است، توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۶۰۰ اندازه‌گیری و میزان بقای سلولی پس از تیمار محاسبه گردید. نتایج تست MTT توسط نرم‌افزار SPSS به روش "تاکی" آنالیز شد.

نتایج

نتیجه تهیه مواد لبنی سنتی

طی جمع‌آوری مواد لبنی سنتی، ۸ نوع، بیش از ۸۰ نمونه ماده‌ی لبنی از منطقه ورزقان و حومه به شرح جدول ۲ جمع‌آوری گردید.

جدول ۲: مواد لبنی سنتی جمع‌آوری‌شده

ردیف	نوع ماده لبنی	کد مخفف ماده لبنی	تعداد	منطقه
۱	پنیر	Ch	۱۰	ورزقان و حومه
۲	پنیر کوزه	Jch	۵	ورزقان و حومه
۳	کشک	C	۱۰	ورزقان و حومه
۴	شور	Sh	۵	ورزقان و حومه
۵	ماست	Y	۱۵	ورزقان و حومه
۶	شیر	M	۲۰	ورزقان و حومه
۷	آب پنیر	Wch	۱۰	ورزقان و حومه
۸	کره حیوانی	B	۵	ورزقان و حومه

جداسازی نتایج کشت سوسپانسیون میکروبی و بررسی کلنی‌های ظاهرشده

پس از گرماگذاری کشت‌ها، کلنی میکروارگانیسم‌های موجود در ماده لبنی روی محیط ظاهر شد. تهیه لام ازکلنی‌های احتمالی و رنگ‌آمیزی گرم، با هدف جداسازی لاکتیک اسید باکتری‌ها انجام شد. شکل مرسوم لاکتوباسیل‌ها و لاکتوکوکوس‌ها ملاک انتخاب کلنی‌ها بود. شکل ۱ تعدادی از این باکتری‌ها را نشان می‌دهد. همچنین در این تست به دلیل عدم تشکیل حباب، همه‌ی جدایه‌ها

[12] Tetrazole

[13] Formazan

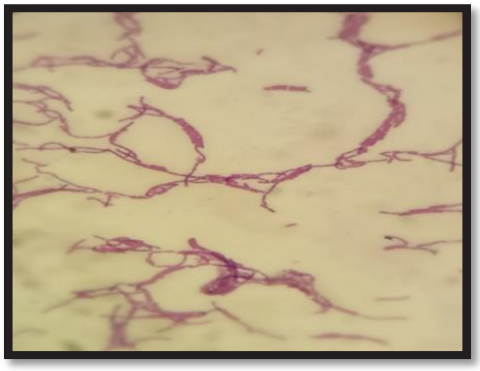
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

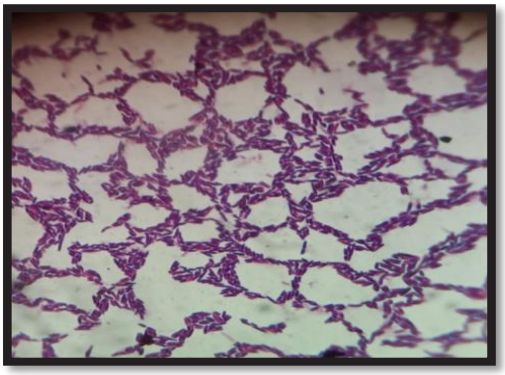
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

کاتالاز منفی بودند که تایید اولیه بر احتمال جداسازی لاکتیک اسید باکتری‌ها بود.

نتایج جداسازی

طی این مطالعه، به‌طورکلی در مجموع مواد لبنی ۱۳ جدایه جداسازی و کدگذاری شد (جدول ۳). از همه‌ی لاکتیک اسید باکتری‌ها جداسازی شده کشت خالص انجام گرفت سپس نتایج شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه با انجام تست‌های بیوشیمیایی به صورت زیر حاصل شد که هر ۱۳ جدایه مورد بررسی در این تست، VP^- (ناجور تخمیر) بودند و همه‌ی جدایه های ناجور تخمیر اجباری مورد بررسی در این تست، Arg^+ بودند. پس از مشخص شدن دسته‌بندی هر یک از جدایه‌ها تست تخمیر سایر کربوهیدرات‌ها طبق کتاب برجی برای هر دسته انجام شد. تست تخمیر کربوهیدرات با ترکیبات قندی مختلف برای جدایه‌های MA1، YM4،CV2 ،CA1 ،YA1 MV2،YN3،MV2 ، CR1،YN1، MS1، MV1،CA1 استفاده شد (جدول ۴).





شکل ۱: باکتری‌های لاکتوباسیل در رنگ آمیزی گرم با بزرگنمایی ۱۰۰۰ ×.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

جدول ۳: جدایه‌های لاکتیک اسید باکتری‌های شناسایی شده

نام باکتری	درصد شباهت به سویه شناسایی شده در NCBI	شکل	جدایه
Lactobacillus paracasei MA1	٪ 99.79	Bacilli	MA1
Entrococcus durans MV3	٪ 97.43	Cocci	YN2
Entrococcus durans YN3	٪ 99	Cocci	CA3
Entrococcus faecalis YA1	٪ 97.43	Cocci	CR4
Enterococcus faecalis MV2	٪ 96.95	Cocci	MS5
Enterococcus faecium CV1	٪ .96.88	Cocci	MS6
Enterococcus faecium CV2	٪ .96.95	Cocci	CA7
Enterococcus faecium YN4	٪ 98.89	Cocci	MA8
Lactobacillus brevis CA1	٪ 98.32	Bacilli	MV9
Lactobacillus brevis MV1	٪ 99.79	Bacilli	CA10
Lactobacillus acidipiscis	٪ .98.32	Bacilli	MV11
Lactobacillus plantarum MS1	٪ 98.32	Bacilli	CV12
Lactobacillus delbruekii YN1	٪ 98.32	Bacilli	MV14
Lactobacillus fermentum CR1	٪ 98.32	Bacilli	MV15

مخفف جدایه باکتری‌ها: (Milk of Arajan) MA- (Milk of Varzeghan) MV -(Yogurt of Nojemehr)YN-
(Crud of Rashtbar) CR – (Crud of Arajan) CA -(Crud of Varzeghan) CV - Milk of Sohrn)MS

جدول ۴: نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط لاکتیک اسید باکتری‌ها

	گلوکز	گالاکتوز	لاکتوز	ارابینوز	رافینوز	ترهالوز	ملیبیوز	مالتوز	مانیتول	سوربیتول	گزیلوز	ساکارز
MA1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
MV2	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-
YN3	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
YA1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
MV2	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-
CV1	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
CV2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
YM4	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+
CA1	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
MV1	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
MS1	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
YN1	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CR1	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

نتایج رشد در دماهای مختلف

تمامی جدایه‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس رشد کردند، اما رشد آن‌ها در دمای ۱۵ و ۴۰ درجه متفاوت بوده است (در دمای ۱۵ درجه رشد کمتر و دردمای ۴۰ درجه رشد بیشتر بود). جدایه‌های *Lactobacillus plantarum* MS1 و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 در ۱۵ درجه سلسیوس قادر به رشد نبودند، اما در دمای ۴۰ درجه سلسیوس رشد قابل ملاحظه‌ای داشتند.

انتخاب پروبیوتیک مناسب

برای دستیابی به پروبیوتیک مناسب مقاومت به pH اسیدی، نمک صفرا و فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج آزمون مقاومت به اسید

از سویه‌های منتخب جهت آزمون‌های پروبیوتیکی، اکثر سویه‌ها در PH= ۴ به مدت ۳ و ۴ ساعت زنده ماندند و تعداد کلنی‌های شمارش شده آن‌ها مطابق دستورالعمل سازمان ملی استاندارد به تعداد ۱۰۶ رسیده بودند (جدول ۵).

جدول ۵ : نتایج آزمون مقاومت به اسید

ردیف	جدایه	تعداد کلنی‌ها در لحظه‌ی صفر	تعداد کلنی‌ها بعد ۳h
۱	MA1	> ۱۰۶	۲۰۰
۲	MV2	> ۱۰۶	۸۵
۳	YN3	> ۱۰۶	عدم رشد
۴	YN1	> ۱۰۶	۳۰۰
۵	MV2	۵۰	عدم رشد
۶	CV1	> ۱۰۶	> ۱۰۶
۷	CV2	> ۱۰۶	۲۰۰
۸	YM4	> ۱۰۶	> ۱۰۶
۹	CA1	> ۱۰۶	> ۱۰۶
۱۰	MV1	> ۱۰۶	۲۲۰
۱۱	MS1	> ۱۰۶	۲۰۰
۱۲	YN1	> ۱۰۶	۳۰۰
۱۳	CR1	> ۱۰۶	۲۴۰

نتایج آزمون مقاومت به نمک های صفراوی

مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفراوی براساس مقایسه‌ی دو پارامتر اندازه‌گیری شد که شامل تاخیر در رشد سویه‌ها به دلیل اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی و اندازه‌گیری رشد سویه‌ها می‌باشد. هر سویه در محیط کشت MRS مایع بدون نمک‌های صفراوی (کنترل) و محیط کشت مایع دارای ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی تلقیح شد و توانایی رشد، با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در فاصله زمانی نیم ساعت کنترل شد. رسم منحنی رشد با جذب نوری اولیه‌ی تقریبا ۰/۰۳ شروع و تا رسیدن جذب نوری به مقدار ۰/۳ در طول زمان ۶ الی ۷ ساعت دنبال شد. تحلیل تاثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد، در همین بازه زمانی انجام شد. سویه‌های *Lactobacillus plantarum* MS1 و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 در مقایسه با سایر سویه‌ها سرعت رشد بالاتری را نشان دادند (جدول۶).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

جدول۶: نتایج آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی

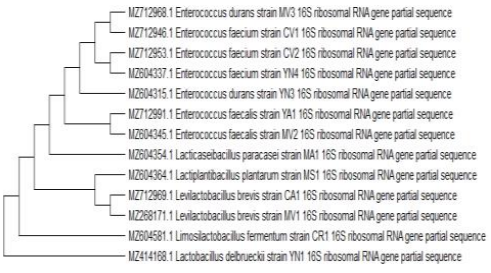
ردیف	جدایه	تعداد کلنی‌ها در لحظه‌ی صفر	تعداد کلنی‌ها بعد ۳h
۱	MA1	> ۱۰۶	۲۰۰
۲	MV2	> ۱۰۶	۱۵۰
۳	YN3	> ۱۰۶	۲۱۰
۴	YN1	> ۱۰۶	۲۸۰
۵	MV2	۲۰	۱۸۰
۶	CV1	> ۱۰۶	> ۱۰۶
۷	CV2	> ۱۰۶	۱۵۰
۸	YM4	> ۱۰۶	۲۰۰
۹	CA1	> ۱۰۶	۱۵۰
۱۰	MV1	> ۱۰۶	۱۸۰
۱۱	MS1	> ۱۰۶	۱۰۰
۱۲	YN1	> ۱۰۶	۳۰۰
۱۳	CR1	> ۱۰۶	۱۵۰

نتایج ارزیابی اثرات ضد میکروبی

در ادامه این پژوهش برای بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره جدایه ها، طیفی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و قارچ *کاندیدا کفیر* به روش دیسک دیفیوژن مورد آزمایش قرار گرفتند که بیشترین اثر ضد میکروبی عصاره مربوط به باکتری های *اشریشیا کلی* و *کلبسیلا پنومونیه* با قطر هاله عدم رشد ۱۴ mm و در قارچ *کاندیدا کفیر* با قطر هاله عدم رشد ۱۶ mm بود و فعالیت ضد میکروبی کمتری نسبت به گونه‌های گرم مثبت *باسیلوس سوبتیلیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند (جدول ۷).

شناسایی مولکولی

واکنش PCR برای هر ۱۴ سویه برتر (که پس از انجام تست‌های سلولی تعیین گردیدند) انجام‌گرفته و نتایج با الکتروفورز بررسی و باند مربوط به توالی تکثیرشده‌ی جدایه ها با حدود 1500bp طول، در ژل مشاهده شد. پس از تایید محصولات خالص‌سازی شده بر روی ژل آگارز، به منظور توالی‌یابی به شرکت زیست پرتو ارسال شدند. توالی‌های مربوط به ژن *16SrRNA*، هر سویه که از تکثیر توالی‌های *16SrRNA* با پرایمرهای مستقیم و معکوس حاصل شده بود، با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی Chromas و BLAST مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و Align شدند (شکل ۲).



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی برای ۱۴ سویه ی برتر پروبیوتیکی

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

نتایج بررسی سمیت سلولی(MTT)

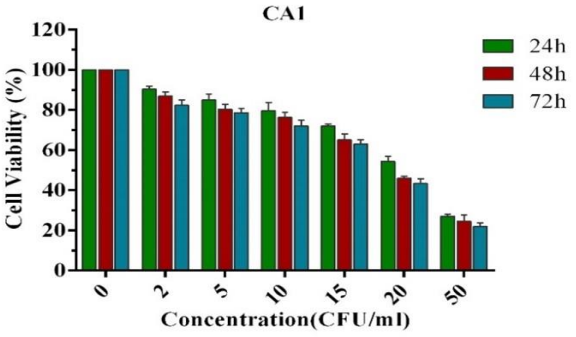
به منظور بررسی اثرات سمیت جدایه‌های گرفته شده بر روی سلول‌های نرمال و تعیین غظت IC_{50} (غلظتی از دارو که موجب مهار رشد در ۵۰ درصد از سلول ها می‌شود) برای هر کدام از آنها، از تست MTT استفاده شد. بدین منظور مقدار 10^4 سلول، از سلول‌های HFF2 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه با میزان FBS ۵ ٪ کشت داده شد و در غلظت‌های مختلف (۵۰، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵، ۰) CFU/ml از ۱۳ جدایه، در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. ضمنا به منظور جلوگیری از تاثیر خطاهای احتمالی، در هر دوز از جدایه‌ها، سلول‌ها به صورت سه تکرار کشت داده شده و تیمار گردیدند (شکل‌های ۳ تا ۶). و در نهایت جذب هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر خوانده شد و درصد بقاء برای هر غلظت در زمان مربوطه نسبت به کنترل محاسبه شد. هم‌چنان که مشاهده می‌گردد، جدایه‌ها، بیشتر اثرات سمیت وابسته به غلظت نشان می‌دهند و افزایش زمان تیمار تغییر قابل توجهی بر روی زیستایی سلول‌ها نشان نمی‌دهد. بر این اساس میزان زیستایی سلولی با افزایش غلظت تیمار کمتر می‌گردد. همان‌طور که مشاهده می‌کنید، میزان IC50 برای جدایه‌ها در جدول ۸ در تایم‌های تیماری ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط نرم افزار Graph pad prism محاسبه شده است. بررسی میزان IC50 جدایه‌ها نشان می‌دهد که اثر سمیت جدایه‌ی YN1 با میزان IC50 ، (CFU/ml) ۲۹/۹۳، ۴۷/۷۳، ۵۴/۵۲ به ترتیب در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، بر روی سلول-های نرمال HFF2 کمتر از بقیه جدایه‌ها بوده و بعد از آن به ترتیب CR1،MS1 کمترین اثر را بر روی سلول‌های نرمال دارند. در نتیجه برای تحقیقات ما مطلوب‌تر می-باشند.

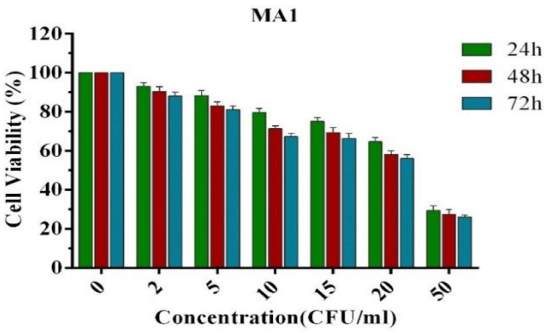
جدول ۷: نتایج ارزیابی اثرات ضد میکروبی جدایه‌ها بر حسب قطر هاله عدم رشد (اندازه هاله ها بر حسب میلی متر)

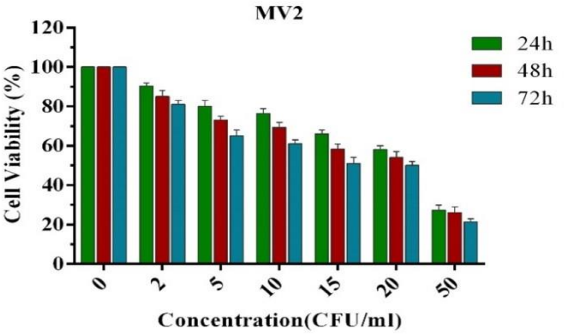
ردیف	جدایه	*اشریشیا کلی*	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*کلبسیلا پنومونیه*	*کاندیدا کفیر*	*باسیلوس سوبتیلیس*
۱	MA1	۱۴	۱۰	۱۴	۱۶	۱۰
۲	MV2	۱۲	۸	۱۲	۱۰	۸
۳	YN3	۱۴	۱۲	۱۳	۱۴	۹
۴	YA1	۱۳	۱۲	۱۳	۱۴	۱۰
۵	MV2	۱۱	۱۲	۱۲	۱۰	۹
۶	CV1	۱۰	۹	۱۱	۱۰	۸
۷	CV2	۱۱	۹	۱۱	۱۲	۱۰
۸	YN4	۱۳	۱۲	۱۲	۱۳	۱۱
۹	CA1	۱۲	۱۱	۹	۱۱	۸
۱۰	MV1	۱۰	۱۰	۹	۱۲	۹
۱۱	MS1	۱۴	۱۰	۱۳	۱۰	۹
۱۲	YN1	۱۴	۱۱	۱۳	۱۶	۱۱
۱۳	CR1	۱۲	۱۱	۱۰	۱۲	۸

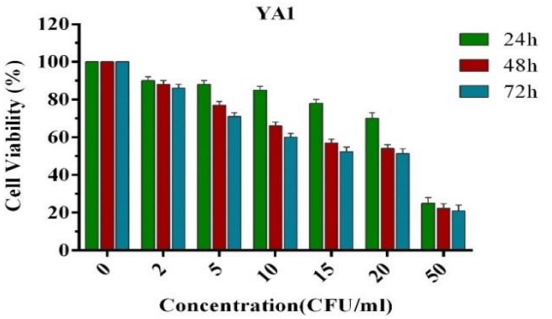
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]



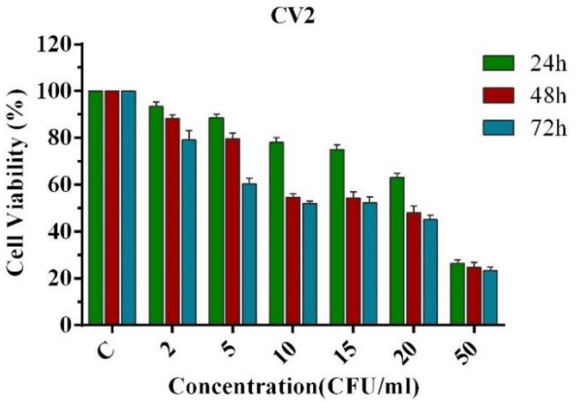


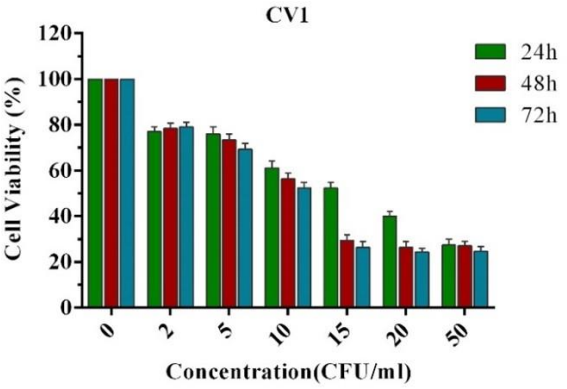


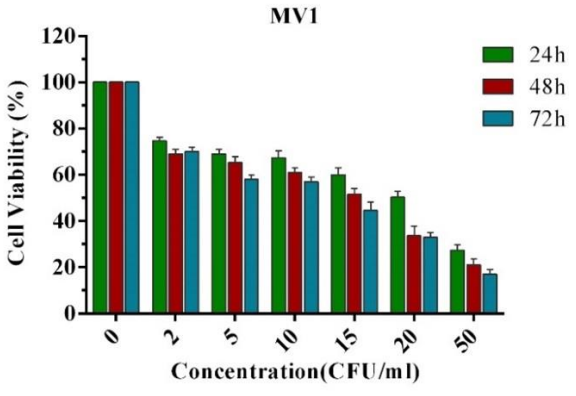


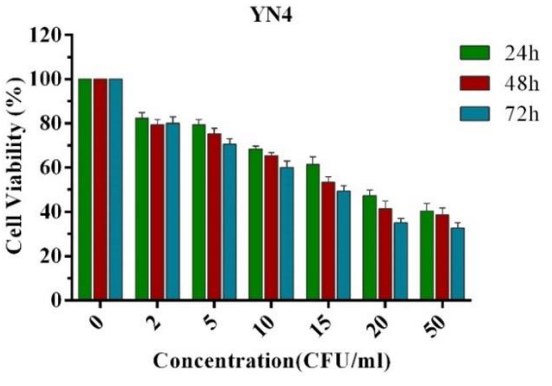
شکل ۳. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های CA1، YA1،MV2،MA1 با تست MTT. بر روی رده‌ی سلولی HFF2 با غلظت‌های مختلف (۵۰ CFU/ml تا ۰)، در زمان‌های تیماری۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت که نشان می‌دهد در

دو جدایه CA1 و MA1 در مقایسه با دو جدایه دیگر تا غلظت ۲۰ CFU/mlبیشتر از ۶۰ درصد سلول‌ها زنده و فعال هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل ± انحراف معیار (SD) می‌باشد





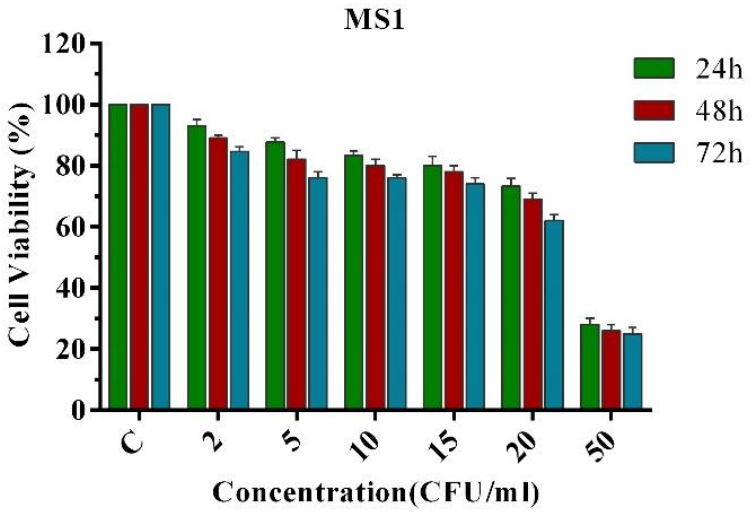




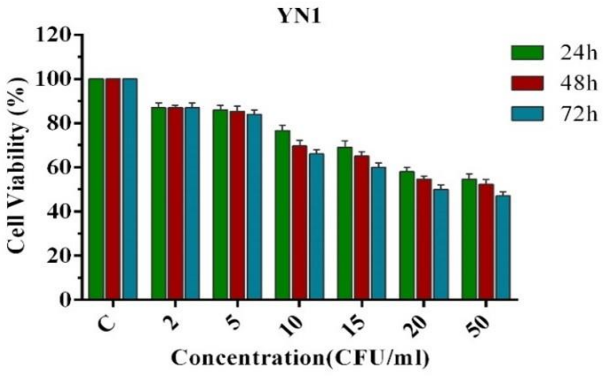
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

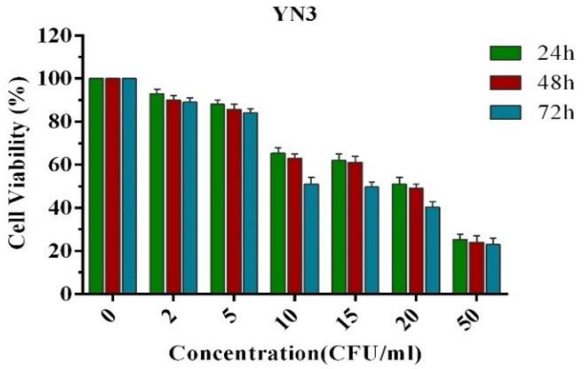
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

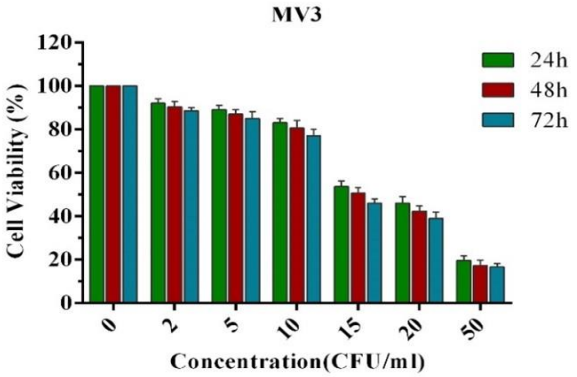
شکل ۴. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های CV2،CV1،MV1،YN4 با تست MTT. بر روی رده سلولی HFF2 با غلظت‌های مختلف (CFU/ml ۵۰ تا ۰)، در زمان‌های تیماری۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت که نشان می‌دهد تا غلظت CFU/ml ۱۰ در هر چهار جدایه بیشتر از ۵۰ درصد سلول‌ها زنده و فعال هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل ± انحراف معیار (SD) می‌باشد.

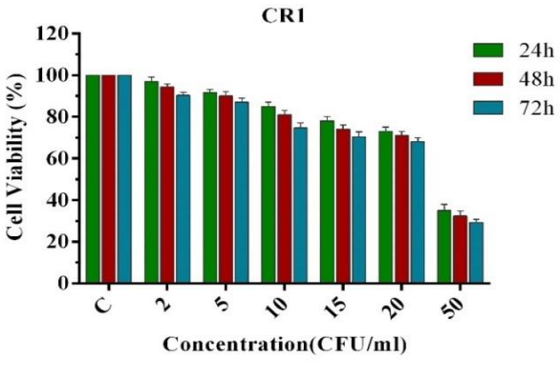


شکل ۵. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه‌ی MS1 با تست MTT. بر روی رده‌ی سلولی HFF2 با غلظت‌های مختلف (CFU/ml ۵۰ تا ۰)، در زمان‌های تیماری۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت، که نشان می‌دهد تا غلظت تیماری CFU/ml ۲۰ تقریبا ۷۰ درصد سلول ها فعال هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل ± انحراف معیار (SD) می‌باشد.









[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

شکل ۶. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های YN1،YN3،MV3،CR1 با تست MTT. بر روی رده سلولی HFF2 با غلظت‌های مختلف (CFU/ml ۵۰ تا ۰)، در زمان‌های تیماری۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت که نشان می‌دهد در تیمار سلول‌ها با جدایه‌های YN1 و CR1 در مقایسه با دو جدایه‌ی دیگر بیشتر از ۵۰ درصد سلول‌ها فعال و زنده هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل ± انحراف معیار (SD) می‌باشد

.

جدول ۸: میزان IC_{50} جدایه‌های مختلف بر روی رده سلولی نرمال HFF2 در تایم های تیماری مختلف

IC_{50} (CFU/ml) / جدایه	24h	48h	72h
CA1	۲۵،۰۷	۲۰،۸۵	۱۸،۷۳
MA1	۲۹،۰۲	۲۴،۷۷	۲۲،۶۸
MV2	۲۴،۶۴	۲۰،۳۵	۱۴،۷۵
YA1	۲۹،۲۶	۱۹	۱۵،۹۵
CV2	۲۷،۱۵	۱۶،۴۲	۱۲،۰۸
CV1	۱۵،۲۲	۹،۸۳	۸،۷۰
MV1	۱۹،۳۳	۱۱،۳۷	۸،۹۴
YN4	۲۵،۴۱	۱۹،۴۳	۱۴،۱۶
YN1	۵۴،۵۲	۴۲،۷۳	۲۹،۹۳
YN3	۲۰،۴۹	۱۹،۲۱	۱۴،۱۸
MV3	۱۸،۹۴	۱۷،۳۹	۱۵،۸۴
CR1	۳۴،۶۶	۳۱،۹۱	۲۸،۶۴
MS1	۳۱،۳۸	۲۹،۱۷	۲۶،۱۶

بحث

رفتارهای فیزیولوژیکی برای حفظ بقای باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش، شامل مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی روده می‌باشد. در مطالعات مختلف اختلاف‌های معنی‌داری در نرخ بقای سویه‌های پروبیوتیک حتی در بین سویه‌های مربوط به یک گونه، در حین عبور از معده و دستگاه گوارش فوقانی مشاهده شده است. در مورد شرایط فیزیولوژیکی باکتری‌های پروبیوتیک در حین عبور از شرایط اسیدی معده مثل فعالیت متابولیکی و تولید ATP دانسته‌های کمی وجود دارد، اما چیزی که به وضوح ثابت شده، این است که مقاومت به شرایط اسیدی معده در بین سویه‌های مختلف یک گونه متفاوت است (۱۲). این تحقیق نشان داد که شیر و ماست تولید شده به روش سنتی منبع مهمی برای باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. بنابرین جداسازی و استفاده از این باکتری‌ها به عنوان استارتر به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

پنیر و ماست‌های صنعتی این امکان را فراهم خواهد کرد که محصولات لبنی با ویژگی‌های مطلوبی از نظر کیفیت به بازار عرضه شده و مصرف کنندگان راه جدیدی برای بهره‌مندی از سلامتی خود خواهند یافت، زیرا مصرف این باکتری‌ها می‌تواند سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی را تقویت کند. هم‌چنان‌که دانشمندان این احتمال را می‌دهند که این باکتری‌ها در آینده‌ای نزدیک در سیستم بهداشت و سلامت انسان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها خواهند شد. در این تحقیق از محصولات لبنی پنیر، پنیر کوزه، کشک، شور، ماست، شیر، آب پنیر و کره حیوانی منطقه شهرستان ورزقان و حومه باکتری‌های پروبیوتیک شناسایی و جداسازی شدند. در مرحله‌ی اول لاکتیک اسید باکتری‌های که دارای پتانسیل پروبیوتیک بالایی بودند، جداسازی شد. پتانسیل پروبیوتیکی که در این تحقیق برای باکتری‌ها در نظر گرفته شد شامل: تحمل شرایط اسیدی و مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی بود که با تعیین این ویژگی‌ها می‌توان اختلاف ایجاد شده در بین سویه‌های پروبیوتیک را بررسی نمود (۱۳). در این تحقیق با استفاده از بافر PBS با ۴ = PH به مدت ۳-۴ ساعت، سویه‌های *Lactobacillus plantarum* MS1 و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 سویه مقاوم به اسید از محصولات لبنی پنیر، پنیر کوزه، کشک، شور، ماست، شیر، آب پنیر و کره حیوانی منطقه شهرستان ورزقان و حومه جمع‌آوری شد. به طور مثال تحقیقات مشابه انجام شده توسط Conway و همکاران در سال ۱۹۸۷ و Fernandez و همکاران در سال ۲۰۰۳ برای انتخاب سویه‌های لاکتوباسیلوس مقاوم به اسید با استفاده از محتوی معده گزارش شده است (۱۴). Conway و همکاران نشان دادند که بقای لاکتوباسیلوس‌ها در بافر PBS نسبت به محتوی معده، به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در محتوی معده بر روی سلول‌های باکتریایی، اندکی پایین‌تر است. آن‌ها بافر PBS با PH مناسب را برای غربال سویه‌های باکتریایی، به منظور حفظ بقاء در شرایط *in vivo* پیشنهاد کردند (۱۵). علاوه براین، سویه‌های پروبیوتیک به دنبال مصرف، توسط خاصیت بافری غذا یا مواد ماتریکس حامل غذایی می‌توانند حفاظت شوند، از این رو برای انتخاب سویه‌های مقاوم به اسید، میکرواورگانیسم‌هایمورد آزمایش لزوما نباید در معرض PH معده قرار بگیرند (۱۶). با توجه به اینکه تحمل محیط اسیدی معده، تنها یکی از ویژگی‌های میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد و برای جلوگیری از دست رفتن سویه‌هایی با سایر خصوصیات پروبیوتیکی مثل مقاومت بالا در برابر نمک‌های صفراوی، توانایی کلونیزاسیون به سلول‌های اپیتلیالی روده‌ای و سایر خصوصیات بیولوژیکی مفید می‌توان انجام آزمایشات را بدون در نظر گرفتن PH آغاز نمود. زیرا می‌توان میکرواورگانیسم‌های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینت سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارشی رساند. در این زمینه یا مطالعه‌ای که Kim و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ انجام دادند، نشان دادند که میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم به طور موثر میکروارگانیسم را از تیمار اسیدی و دمایی در موقع انتقال به روده، بدون تاثیر منفی بر روی عملکرد پروبیوتیکی، حفاظت می‌کند (۱۷). در این تحقیق بعد از جداسازی باکتری‌های مقاوم به اسید، تحمل سویه‌ها به شرایط اسیدی، با انکوباسیون هر یک از سویه در بافر PBS با ۴ =PH به مدت ۳ الی ۴ ساعت تعیین گردید. نتایج حاکی از این است که سویه‌های *Lactobacillus plantarum* MS1 و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 مقاومت بسیار خوبی دارا بودند. بعد از تعیین مقاومت به اسید، مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیراختصاصی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله‌ی غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد وزنی/ حجمی است و برای غربال سویه‌های مقاوم به صفرا، بحرانی و کافی تلقی می‌شود (۱۸). در این مطالعه این غلظت برای ارزیابی قابلیت رشد ۱۵۷ سویه انتخاب شده در حضور نمک‌های صفراوی انتخاب شد که سویه‌ها با سطوح مختلفی از مقاومت قادر به رشد در محیط کشت دارای ۰/۳ درصد نمک صفراوی بودند. در مورد همه سویه‌های آزمایش شده، تاخیر در رشد سویه‌های تیمار داده شده با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل (بدون تیمار) مشهود بود. هم‌چنین، نوسان در میزان مقاومت در بین گونه‌های مختلف مشاهده شد. در این مطالعه آنالیز نتایج به دست آمده از تعیین مقاومت به نمک‌های صفراوی براساس روش Chateau و همکاران که در سال ۱۹۹۴ پیشنهاد کردند، انجام گردید و براساس تاخیر رشد مشاهده شده گروه‌بندی شدند. سویه‌های *Lactobacillus plantarum* MS1 و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 (دارای تاخیر رشد

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

بین ۱۵ و ۴۵ دقیقه) قرار گرفتند و تحمل بالایی به نمک صفراوی نشان دادند. شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر براساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی عدم تکرار پذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز می‌باشد. زیرا علاوه بر متفاوت بودن شرایط کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد. انتخاب محیط کشت و انجام تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی قادر به جدا کردن لاکتوباسیلوس‌ها از باکتری‌هایی با مورفولوژی یکسان نمی‌باشد. بنابراین شناسایی دقیق‌تر در این تحقیق توسط روش‌های مولکولی انجام گرفته است. هم‌چنین نتایج حاصل از تست‌های فنوتیپی پیوستگی و شباهت زیادی را ما بین لاکتوباسیلوس‌ها نشان می‌دهد. لذا تعیین تاکسونومی این جنس تنها به وسیله روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مشکل است (۱۹). در این تحقیق براساس مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و آنالیز نتایج با رسم دندروگرام با برنامه آماری SPSS ، ۱۳ جدایه از محصولات لبنی آذربایجان شرقی جداسازی شدند. Perea و همکاران در سال ۲۰۰۷ تحقیقات خود را بر روی محصولات لبنی کلومبیا انجام دادند. در این تحقیق از روش‌های تست مقاومت به اسید، داشتن فعالیت انتاگونیستی بر علیه *سالمونلا*[14] استفاده شد. انجام واکنش برای ۱۷ سویه جداسازی شده از محصولات لبنی برای ژن *16S rRNA* انجام گردید. نتایج نشان داد که فراوان‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک شناسایی شده، لاکتوباسیلوس دلبروکی[15] و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*[16] هستند (۲۰). در این مطالعه براساس نتایج حاصل از کلاستربندی تست‌های بیوشیمیایی، ۶ سویه از لاکتوباسیلوس و ۷ سویه انتروکوکوس برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ژن *16S rRNA* با پرایمرهای طراحی شده، تکثیر داده شد و بعد از خالص‌سازی برای توالی‌یابی ارسال شدند. نتایج توالی‌یابی در مورد ۱۳ جدایه، حاکی از تشابه ۹۷ درصد توالی‌های مورد نظر با توالی‌های ژن *16S rRNA* ثبت شده در بانک اطلاعاتی بود. سویه *paracasei* MA1، *Entrococcus durans* MV3، *Entrococcus durans* YN3، *Entrococcus faecalis* YA1، *Enterococcus faecalis* MV2، *Enterococcus faecium* CV1، *Enterococcus faecium* CV2، *Enterococcus faecium* YN4، *Lactobacillus brevis* CA1، *Lactobacillus brevis* MV1، *Lactobacillus acidipiscis*، *Lactobacillus fermentum* CR1، *Lactobacillus plantarum* MS1 و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 به عنوان پروبیوتیک مناسب انسانی شناخته شد. در ادامه این پژوهش به بررسی اثرات ضد میکروبی سویه‌های جدا شده پرداختیم. در این مطالعه ۶۰ لاکتیک اسید باکتری جداسازی شد. فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها در سوپرناتانت‌های f_2 ی گونه‌ی *Lactobacillus paracasei* جدا شده از شیر Arajan rurul، *Enterococcus durans* جدا شده از خامه‌ی Goyges solthan فعالیت ضد میکروبی بالاتری نسبت به *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *کاندیدا کفیر* دارند. این گونه‌ها هیچ فعالیت ضد میکروبی نسبت به گونه‌های گرم مثبت نشان ندادند. گونه‌های لاکتیک اسید باکتری‌های انتخاب شده بوسیله‌ی آنالیز ژن *16S rRNA* شناسایی شدند و با Blast در NCBI تایید شدند. گونه M.AR33/4 جدا شده از شیر به عنوان گونه f_2 از *Lactobacillus paracasei* و گونه C.GS22/1 به عنوان *Enterococcus durains* شناسایی شد. براساس نتایج، محصولات سنتی می‌تواند به عنوان یک منبع برای ترکیبات ضد میکروبی جدید دارای پتانسیل بالا که توانایی تولید باکتری لاکتیک اسید دارند، می‌باشد. *Lactobacillus paracasei* و *Enterococcus durains* مناطق ضد میکروبی بین ۸ میلی‌متر تا ۱۴ میلی‌متر در مقایسه با باکتری گرم منفی و *کاندیدا کفیر* نشان دادند. طی این پروژه اثر ضد سرطانی سویه‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی مورد بررسی قرار گرفت. اثر سایکوتوکسیک این مواد ملاحظه شد. گفته می‌شود فعالیت ضد تکثیری باکتری لاکتیک اسید در برابر رشد سلول‌های توموری وابسته به زمان و غلظت است. بررسی نمودارهای حاصل از تست سلولی (تست MTT) نشان داد که اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های این بررسی، بیش از آنکه وابسته به زمان باشد، وابسته به غلظت است. نمودارهای حاصله در کنار اینکه شیب قابل توجهی با افزایش غلظت نشان می‌دادند، تفاوت چندانی طی افزوده شدن زمان نداشتند. در برخی نمونه‌ها حتی درصد بقای سلولی زمان‌های مختلف بهم نزدیک می‌باشند (اثر سایتوتوکسیک نمونه‌ها فقط

[14] Salmonella
[15] Lactobacillus delbrueckii
[16] Streptococcus thermophilus

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

وابسته به غلظت است). در توجیه این نتایج می‌توان گفت اثر سایتوتوکسیک این سویه‌های جدا شده مورد بررسی بصورت آنی بوده و برای تاثیر بیشتر نیاز به گذر زمان نیست. به عبارت دیگر، با گذشت زمان، جدایه‌های مورد بررسی تجزیه شده و توسط سلول‌ها دستخوش تغییر می‌شوند. از بعد درمانی این مسئله از نظر کاهش زمان درمان و هم-چنین کاهش اثرات جانبی با گذشت زمان می‌تواند بسیار قابل توجه باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق باکتری‌های *Lactobacillus paracasei* MA1، *Entrococcus durans* MV3، *Entrococcus faecalis* YA1، *durans* YN3، *Enterococcus faecalis* MV2، *Enterococcus faecium* CV1، *faecium* CV2، *Enterococcus faecium* YN4، *Lactobacillus brevis* CA1، *brevis* MV1، *Lactobacillus acidipiscis* CR1، *fermentum* MS1، *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus delbrueckii* YN1 به عنوان پروبیوتیک انسانی مناسب با اثرات مثبتی در سلامت بدن شناخته‌شده است. بررسی نمودارهای حاصل از تست سلولی (تست MTT) نشان داد که اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های این بررسی، بیش از آن‌که وابسته به زمان باشد، وابسته به غلظت است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

منابع

1. Daniluk U. "Probiotics, the new approach for cancer prevention and/or potentialization of anti-cancer treatment," *J Clin Exp Oncol,* 2012; 1: 2.

2. Suvarna, V and Boby V,"Probiotics in human health: A current assessment, "*Current science,* 2005; 88(11): 17481744.

3.Darsanaki R K, Kolavani MH, Chakoosari, MMD, Shalkeh SE and Tajehmiri A. "Biological control of aflatoxin B1 by probiotic bacteria, *Trends in Life Science,* 2014; 3(1): 47312319.

4. Subhashini S, Lavanya J and Meignanalakshmi S . "In vitro studies on adhesion and the effect of cytotoxicity of bifidobacterium spp. using cell lines," *European Scientific Journal*, 2013; 9(18)

5. Rafter JJ. "The role of lactic acid bacteria in colon cancer prevention," *Scandinavian journal of gastroenterology*, 1995;30(6): 502497.

6. Gopal PK , Prasad J, Smart J and Gill HS. "In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli," *International journal of food microbiology*, 2001;67(3):216207.

7. Suvarna V and Boby V. "Probiotics in human health: A current assessment, "*Current science*, 2005;88(11):17481744.

8. Moncada Reyes ML. "Influence of low sonication intensities at different temperatures on acid tolerance, bile tolerance, protease activity and growth of yogurt culture bacteria Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus and Streptococcus salivarius ssp. Thermophilus; 2011.

9.Heazlewood CK *et al.*, "Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis," *PLoS medicine* , 2008; vol. 5, no. 3.

10. Watts PJ and Lllum L. "Colonic drug delivery," Drug development and industrial pharmacy, 1997;23(9):913893.

11. Ashford M and Fell J."Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration," Journal of drug targeting, 1994;2(3):257241.

12. Ipak G, Vijay K. Juneja MA. Probiotics in Food Safety and Human Health. Taylor & Francis Group.2006.

13. Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal, PK. Selection and Characterization of Lactobacillus and BifidobacteriumStrains for Use as Probiotic. International Dairy Journal, 1998;8: 993- 1002.

14. Fernandez MF, Boris S, Brbes C. Probiotic Properties of Human Lactobacilli strains to be Used in the Gastrointestinal Tract. Journal of Applied Microbiology, 2003; 94: 449- 455

15. Conway PL, Gorbach SL, Goldin, BR. 1987; Survival of Lactic Acid Bacteria in the Human Stomach and Adhesion to Intestinal Cells. Journal of Dairy Science. 2003; 70: 1- 12.

16. Coolins MD, Gibson GR. 1999; Probiotics, Prebiotics and Synbiotics: Approaches for Modulating the Microbial Ecology of The Gut. American Clinical Nutrition 69: 1052- 1057.

17. Kim S, Yong Cho S, Song O, Shin IS, Su Cha D, Park H. Effect of Microencapsulation on Viability and Other Characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. Food Science and Technology, 2007; 41(3): 493- 500.

18. Pennacchia C, Ercoloni D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of LactobacillusStrains from Fermented Sausages for Their Potential Use as Probiotics. Meat Science, 2004; 67: 309- 317.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

19. Ayele N, Siv A, Goran M. Randomaly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Profiles, 2001.

20. Perea Velez M, Hermans K, Verhoeven TL, Lebeer SE, Vanderleyden J, Keersmaecker SC. Identification and Characterization of Starter Lactic Acid Bacteria and Probiotics from Columbian Dairy Products. Journal of Applied Microbiology, 2007; 103(3): 666- 674.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1402.13.51.5.7] [Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-06-19]