New Cell Mol Biotech
j.10/39 , 2020

Research article

Scan online to view this article

Molecular identification of lactobacilli isolated from traditional cheeses of Bandar Abbas city

Niloofar Bazarcheh Shabestari,Masoumeh Hajirezaei*

Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Abstract

Aim and Background: *Lactobacilli* are Gram-positive, catalase-negative, non-spore forming, rod-shaped organisms. So far, more than 90 species of these bacteria have been identified. There are several strains of probiotic Lactobacilli in a wide range of human food products. Identification of these bacteria in traditional dairy products makes it possible to use them in the production of delicious industrial dairy products. The selection of reliable methods for the identification of *Lactobacilli* is of a particular importance. Biochemical methods are time consuming and ambiguous. Molecular methods are more appropriate and precise and can be a substitute for previous methods. The purpose of this study is the isolation of *Lactobacilli* from bacterial flora in Bandar Abbas traditional cheese and identification these bacteria by using PCR as an effective tool for the recognizing the isolated strains.

Materials and Methods: Fifty samples of traditional cheese were collected from Bandar Abbas and strains were obtained by phenotypic methods.16 s rRNA primers were used to identify their molecular identity. Then the PCR product was sent to Poya Gene Gostar for sequencing. Obtained sequences were blasted in NCBI GenBank.

Results: 3 strains of *Lactobacillus* include *Lactobacillus murinus, Lactobacillus helviticus* and *Lactobacillus planatrum* were identified.

Conclusion: These three strains improve the quality of dairy products in this area and can be used in products manufactured in the industry.

Keywords: *Lactobacillus*, Cheese, 16srRNA, Sequencing, PCR

Corresponding author:
Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran
Email: ma.hajirezaei@gmail.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۱۰ - شماره -۳۹ تابستان ۱۳۹۹
مقاله پژوهشی

شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیرهای سنتی شهرستان بندرعباس

نیلوفر بازارچه شبستری، معصومه حاجی رضایی*

گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان،دانشگاه آزاد اسلامی،کرمان،ایران

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

چکیده:

سابقه و هدف: *لاکتوباسیل‌ها* ارگانیسم‌هایی گرم‌مثبت، کاتالاز منفی، بدون اسپور و میله‌ای شکل هستند. تاکنون بیش از ۹۰ گونه از این باکتری‌ها شناخته شده است. سوش‌های متعددی از لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک در طیف وسیعی از محصولات غذایی انسان وجود دارد. شناسایی این باکتری‌ها در محصولات لبنی سنتی، امکان استفاده از آن‌ها را در تولید فرآورده‌های لبنی صنعتی مطبوع‌تر فراهم می‌آورد. انتخاب روش‌های قابل‌اطمینان، برای شناسایی لاکتوباسیل‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. روش‌های بیوشیمیایی وقت‌گیر و ابهام‌آمیز هستند. روش‌های مولکولی، مناسب‌تر و دقیق‌تر بوده و می‌توانند جایگزین روش‌های قبلی شوند. هدف از این تحقیق، جداسازی لاکتوباسیل‌ها از فلور موجود در پنیر سنتی شهرستان بندرعباس و شناسایی آن‌ها با استفاده از روش مولکولی PCR به‌عنوان یک ابزار مؤثر در شناسایی سویه‌های جدا شده است.

مواد و روش‌ها: تعداد ۵۰ نمونه پنیر سنتی از شهرستان بندرعباس جمع‌آوری و سویه‌های لاکتوباسیل توسط روش‌های فنوتیپی جدا شدند. برای شناسایی مولکولی آن‌ها، از پرایمرهای ۱۶s rRNA استفاده گردید. سپس محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت پویا ژن گستر ارسال شد. توالی‌های به‌دست‌آمده در بانک ژنی NCBI بلاست شدند.

یافته‌ها: در مجموع ۳ سویه *لاکتوباسیل* شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* (*Lactobacillus plantarum*)، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (*Lactobacillus helveticus*) و *لاکتوباسیلوس مورینوس* (*Lactobacillus murinus*) شناسایی شد.

نتیجه‌گیری: این سه سویه کیفیت محصولات لبنی این منطقه را تأمین نموده و پتانسیل کاربرد در محصولات تولید شده در صنعت را دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیل*، پنیر، ۱۶s rRNA، تعیین توالی، PCR.

مقدمه

در صنعت به‌دلیل توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک در تولید اسیدلاکتیک و هم‌چنین به علت ایجاد طعم‌های مختلف، ترکیب‌های مغذی و بافت مناسب از این باکتری‌ها به‌عنوان نگهدارنده و استارتر جهت تولید پنیر، تخمیر غذاهای گیاهی و گوشت، تولید شراب و آب‌جو استفاده می‌شود (۱). مهم‌ترین جنس‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل: *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *انتروکوکوس*، *استرپتوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *لوکونوستوک* و *بیفیدوباکتریوم* هستند. باکتری‌های اسیدلاکتیک،

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان،دانشگاه آزاد اسلامی،کرمان،ایران
پست الکترونیکی: ma.hajirezaei@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۳

باکتری‌های گرم‌مثبت، بی‌حرکت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، احیا نیترات منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که قادر به ذوب ژلاتین و تولید ایندول نیستند. در حال حاضر بیش از صد گونه از این جنس شناسایی شده است (۴-۲). جنس *لاکتوباسیلوس* بزرگ‌ترین جنس در گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هتروژن است. *لاکتوباسیلوس‌ها* باکتری‌های میله‌ای شکل به‌طول ۱۰-۱ و عرض ۱/۲-۰/۵ میکرون هستند. این باکتری‌ها با این‌که فاقد کاتالاز و سیتوکروم اکسیداز هستند، ولی در مجاورت اکسیژن هوا رشد می‌کنند و میکروآئروفیل بوده، در حضور هوا رشد کمی دارند و وجود ۵٪ دی اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آن‌ها می‌شود. دمای بهینه رشد آن‌ها بین ۴۰-۳۰ درجه سلسیوس است اما توانایی رشد تا دمای ۵۳-۵۰ درجه سلسیوس را نیز دارند.

لاکتوباسیل‌ها قدرت تحمل اسید را در محیط داشته و هرچند pH بهینه برای رشد آن‌ها ۵/۸- ۵/۵ است اما به‌طورکلی در pH کم‌تر از ۵ نیز قادر به رشد هستند، برای تأمین انرژی هیدرات‌های کربن را مورداستفاده قرار داده، اسیدلاکتیک تولید می‌کنند (۵). سویه‌های *لاکتوباسیلوس* باعث تقویت سد مخاطی روده شده که این امر موجب حفظ و ارتقاء سطح ایمنی می‌شود. هم‌چنین سبب کاهش میزان بیماری‌های التهابی روده و سندرم روده تحریک‌پذیر می‌شود. (۶).

پنیر یکی از فرآورده‌های تخمیری مهم شیر در سطح جهان است. هر چند پنیرهای صنعتی به‌دلیل پاستوریزاسیون، کیفیت بهداشتی بهتر و بافت یکنواخت-تری دارند ولی به-دلیل پاستوریزاسیون و استفاده از آغازگرهای تجاری مشخص طعم پنیرهای سنتی را ندارند و از لحاظ برخی ویژگی‌های حسی بسیار ضعیف هستند. پنیرهای سنتی به-دلیل تنوع جنس و گونه‌های میکروبی محلی و بومی موجود در شیرها، دارای دامنه طعمی گسترده‌تری هستند (۷). برای تولید پنیرهای صنعتی با طعم‌های مناسب، لازم است از آغازگرهای بومی بعد از پاستوریزاسیون استفاده گردد (۴) در سال‌های اخیر سویه‌های بومی *لاکتوباسیل‌ها* به‌دلیل ویژگی-هایی هم‌چون مقاومت ذاتی به فاژهای مخرب، خاصیت ضدمیکروبی و توانایی در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع غذاها و فرآورده‌های تخمیری مورد توجه قرار گرفته‌اند. به‌عنوان مثال از *لاکتوباسیلوس دلبروکی* (*lactobacillus delbrueckii*)، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (*Lactobacillus helveticus*) و *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (*lactobacillus lactis*) به‌عنوان استارتر جهت تولید پنیرهای سفت استفاده می‌کنند (۸،۹). لذا آگاهی از فلور باکتری‌های اسیدلاکتیکی موجود در پنیرهای سنتی امکان تهیه آغازگر برای تولید محصولات صنعتی سالم‌تر، استاندارد و با طعم بهتر را فراهم می‌کند (۱۰). در همین راستا مطالعه‌های گسترده‌ایی برای شناسایی این باکتری‌ها در محصولات غذایی مختلف صورت گرفته است. در آفریقای جنوبی محصولات لبنی سنتی مورد بررسی قرار گرفتند و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactobacillus plantarum*) و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* در آن‌ها شناسایی شدند (۱۱). در کنیا نیز *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (*lactobacillus paracasei*)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (*lactobacillus fermentum*)، *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدو فیلوس* (*lactobacillus acidophilus*) در محصولات لبنی سنتی شناسایی شدند (۱۲). در سال ۲۰۰۵ از ماست سنتی *لاکتوباسیل دلبروکی* جداسازی شد (۱۳). در سال ۲۰۰۷ نیز از محصولات لبنی سنتی به نام کاساوا در آفریقای جنوبی سه گونه از *لاکتوباسیل‌ها* به نام‌های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پنتاسوس*(*lactobacillus pentosus*) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی و شناسایی شدند (۱۴).

در کشور صربستان با مطالعه بر روی محصول سنتی کاجماک سه گونه *لاکتوباسیوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس کفیری* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را شناسایی و جداسازی کردند (۱۵).

در ایران به‌منظور تهیه محصولات با کیفیت بالاتر مطالعه هایی بر روی *لاکتوباسیلوس‌ها* صورت گرفته است. گروهی از محققین *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پنتاسوس* را از پنیر شناسایی کردند (۱۶،۱۷).

لاکتوباسیل‌های موجود در برخی از فرآورده‌های لبنی استان‌های کرمانشاه، کردستان، لرستان مرکزی و ایلام هم-چون ماست، دوغ و شیر نیز جداسازی و شناسایی شدند (۳).

در تحقیقی مشابه در سال ۲۰۱۱، Hasani و همکاران نیز گونه های متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* را از پنیر لیقوان جداسازی کردند(۱۸).

Tafvizi و همکاران نیز در سال ۲۰۱۳ از ترخینه و دوغ براساس توالی‌یابی ناحیه 16sRNA چهار سویه با تشابه بالا به *لاکتوباسیلوس کازئی* جداسازی و شناسایی کردند (۱۹).

استان هرمزگان باتوجه‌به وجود قومیت‌های مختلف در آن، دارای انواع غذاهای سنتی به‌ویژه فرآورده‌های حاصل از شیر است. پنیر باتوجه‌به ویژگی‌های تنوع طعمی و امکان اضافه کردن انواع افزودنی‌ها به آن نسبت‌به دیگر فرآورده‌ها دارای تنوع بیش‌تری است. هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیل‌های* موجود در پنیر سنتی شهرستان بندرعباس به‌روش مولکولی است. این اقدام اولین قدم برای توسعه یک آغازگر جهت استفاده در سطح صنعتی برای تولید محصولات سالم و باطعم و بافت بهتر است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

تعداد ۵۰ نمونه پنیر سنتی در بهار ۱۳۹۷ از شهر بندرعباس در استان هرمزگان، تحت شرایط استریل در فالکون‌های درب‌دار استریل جمع‌آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها در شرایط استریل و در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان انجام مراحل بعدی، نگهداری شدند (۲۰).

آماده‌سازی نمونه‌ها

۵ گرم نمونه تحت شرایط استریل به ۴۵ میلی‌لیتر محلول استریل سیترات سدیم (ایلیا طب،ایران) (۲٪ وزنی/حجمی) اضافه شد و به مدت ۱ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. سپس محلول رویی به‌عنوان رقت 10^{-1}برای تهیه رقت‌های بعدی (رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6}) مورد استفاده قرار گرفت (۱۸).

برای جداسازی *لاکتوباسیل‌ها* ازسری ۵ تایی، لوله‌های حاوی ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی محیط کشت اختصاصی MRS آگار استریل (های‌مدیا، هند)، به‌روش پخش کردن کشت داده شد. به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک نوع A (مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری شد. کشت‌ها در دو تکرار انجام و در بازه زمانی ۴۸ الی ۷۲ ساعت، نمونه‌های کشت داده شده از لحاظ وجود یا عدم وجود *لاکتوباسیل* مورد بررسی قرار گرفتند. (۲۱).

کلنی‌هایی که ازلحاظ شکل، اندازه، کدر یا شفاف بودن (قوام) و سایر ویژگی‌های ظاهری متفاوت بودند، به‌صورت جداگانه به‌منظور دریافت کلنی‌های تک روی محیط MRS آگار (های مدیا، هند) ۲ الی۳ بار کشت داده شد و به‌مدت ۷۲ ساعت، دمای ۳۰ درجه سلسیوس در جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک نوع A گرمخانه‌گذاری گردید. سپس تمامی کلنی‌های مذکور از لحاظ شکل ظاهری، واکنش گرم و آزمون کاتالازی مورد آزمایش قرار گرفتند (۱۸). تمامی باکتری‌های گرم مثبت،کاتالاز منفی بدون اسپور به‌عنوان *لاکتوباسیل* در نظر گرفته شدند.

تعیین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها

پس از استریلیزاسیون محیط کشت فنل رد براث (مرک، آلمان)، قندهای موردنظر (شامل: گلوکز، سوربیتول، آرابینوز، لاکتوز، گالاکتوز، مانیتول و سوکروز) (مرک، آلمان) با غلظت ۱۰٪ به محیط اضافه شدند. سپس باکتری موردنظر به لوله-ها تلقیح شد. تبدیل رنگ قرمز به زرد نشانه تخمیر قند در نظر گرفته شد (۲۲).

آزمون همولیز

به‌منظور بررسی انواع همولیز (آلفا، بتا، گاما)، جدایه‌های مذکور روی محیط بلادآگار (مرک، آلمان) کشت و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. (۲۳).

آزمون حرکت و تولید ایندول

از محیط SIM (مرک، آلمان) جهت بررسی توانایی جدایه-های مذکور از نظر حرکت و قدرت تجزیه تریپتوفان استفاده شد (۲۴).

بررسی رشد باکتری در دماهای مختلف

به این منظور، جدایه‌ها در محیط MRS براث (های مدیا، هند) کشت و سپس در دماهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های مشکوک به *لاکتوباسیلوس*

برای شناسایی باکتری‌ها به‌روش مولکولی، استخراج DNA با کیت EZ-10 SPIN COLUMN GENOMIC DNA (بیوبیسیک، کانادا) صورت گرفت و غلظت و خلوص نمونه-های استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر بررسی گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای ناحیه ۱۶S rRNA (تکاپوزیست، ایران) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است (۲۵،۲۶).

محصول PCR با استفاده از ژل اگارز ۱/۵ درصد درکنار DNA مارکر kb ۱(سیناژن، ایران) مطالعه شد و نمونه‌های دارای باند ۱۵۰۰bp جهت تعیین توالی به شرکت پویا ژن گستر جهت تعیین توالی ارسال گردیدند.

آنالیز نتایج تعیین توالی

توالی‌های به‌دست آمده در سایت NCBI با ژنوم ژنوتیپ-های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها بلاست شده و ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی تعیین گردید.

نتایج

آزمون‌های کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم

نمونه‌های کاتالاز منفی و گرم مثبت برای ادامه کار انتخاب شدند (شکل ۱).

بررسی مورفولوژیکی و رشد در دماهای مختلف

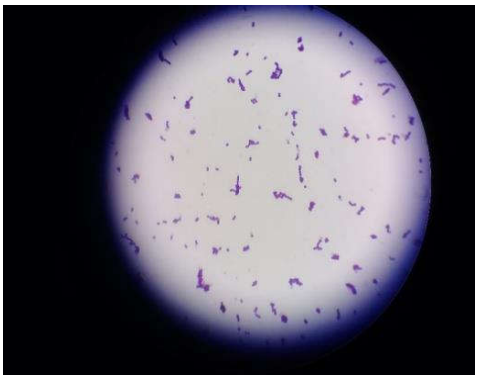
باسیل‌ها و کوکوباسیل‌های گرم‌مثبت کاتالاز منفی، با توانایی رشد در دماهای ۱۵،۳۰ و ۴۵ درجه سلسیوس جهت ادامه کار انتخاب شدند. نتایج این مطالعه های در جدول ۲ آمده است.

آزمون تخمیر قندها

نتایج تست تخمیر ۷ قند، برای باکتری‌های جدا شده در جدول ۳ آمده است.

آزمون همولیز

آزمون همولیز برای کلنی‌های منتخب صورت گرفت. جدایه-های L۱۵، L۱۶، L۱۹ و L۳۵ بدون همولیز (گاما)، L۱۷، L۱۸، L۲۰ و L ۱۴ همولیز کامل (بتا)، L ۳۰، L۳۳ و L۸ همولیز ناقص (آلفا) را نشان دادند.



شکل ۱- تصویر جدایه‌های *لاکتوباسیل* رنگامیزی شده به‌روش گرم

بررسی تولید ایندول و حرکت (SIM)

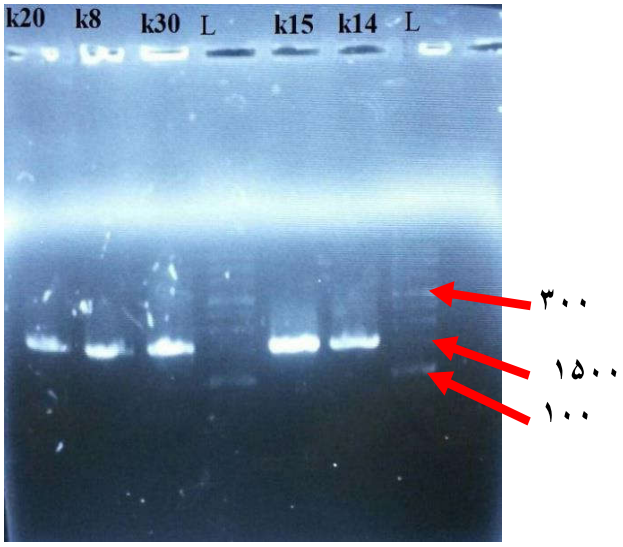
جدایه‌های L15،L14 و L18 متحرک بوده و هیچ‌یک از جدایه‌ها، تجزیه تریپتوفان و تولید ایندول را نداشتند.

نتایج تست‌های بیوشیمیایی برای تعداد ۱۱ جدایه از ۵۰ نمونه *پنیر سنتی* با خصوصیت‌های باکتری‌های *لاکتوباسیل* در کتاب برجی مطابقت داده شد (۴۲).

شناسایی مولکولی

DNA کروموزومی از *لاکتوباسیل‌ها* استخراج شد و با استفاده از جذب نوری DNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و بررسی نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰، غلظت و

خلوص DNA استخراج شده بررسی شد. نمونه‌های دارای غلظت و خلوص مناسب جهت ادامه کار انتخاب شدند. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ۱۶s rRNA صورت گرفت و باندهای bp ۱۵۰۰ در نمونه‌ها مشاهده شد(شکل ۲). محصول PCR حاصل شده، تعیین توالی شد و توالی‌های به‌دست‌آمده در سایت NCBI بررسی و بلاست شدند. باکتری‌های جدا شده در این تحقیق بیش‌ترین تشابه نوکلئوتیدی را با *لاکتوباسیلوس مورینوس* (*Lactobacillus murinus*) (۱ نمونه)، *لاکتوباسیوس هلویتیکوس* (۶ نمونه)، گونه‌های *IMAU60201* (۲ نمونه)، *GM2* (۱ نمونه)، *bcbca-qi-10* (۳ نمونه) و *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم* (۴ نمونه)گونه *LR/16* داشتند.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر با پرایمرهای 16s rRNA. L: شاخص وزن مولکولی.باند ۱۵۰۰ جفت بازی نمایان‌گر تکثیر ناحیه 16s rRNA با پرایمرهای ذکر شده است

بحث

باکتری‌های لاکتیکی به‌طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده‌اند و به‌عنوان فلور غالب در شیر و فرآورده‌های آن محسوب می‌شوند مطالعه‌های مختلف تأثیر *لاکتوباسیل‌ها* بر خواص حسی و فیزیکی پنیرهای سنتی را نشان می‌دهد لذا استفاده از آن‌ها به‌عنوان آغازگر یا کمک آغازگر در تولید محصولات لبنی صنعتی اهمیت پیدا کرده و در سال‌های اخیر مطالعه خصوصیت‌های آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. (۲۰). از آنجا که *لاکتوباسیل*‌ها در پنیرهای رسیده به تعداد زیاد یافت می‌شوند، این باکتری‌ها نقش عمده‌ای را در رسیدن پنیرها از طریق فعالیت‌های بیوشیمیایی‌شان ایفا می‌کنند (۱۰). امروزه استفاده از روش‌های فنوتیپی و تست-های بیوشیمیایی در شناسایی لاکتوباسیل‌ها بسیار رایج است (۲۷). ولی آنچه مسلم است این تست‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند و گاه در بین تعداد زیادی جدایه، خصوصیت‌های فیزیولوژیکی مشابه‌ای دیده می‌شود. به‌علاوه نتایج این روش‌ها همیشه دقیق نیست (۳). نتایجی مانند نتایج تست قندها ممکن است در بسیاری از سویه‌ها به‌طور دقیق مشابه با سویه‌های خاصی در کتاب برجی نباشند. لذا در مطالعه‌های بسیاری از روش‌های ژنتیکی و تعیین توالی جهت شناسایی سوش‌های *لاکتوباسیل‌ها* و تنوع میکروبی موجود در محصولات لبنی و غذایی استفاده می‌شود (۳،۱۹،۲۸-۳۱). در تحقیق حاضراز نمونه‌های پنیر سنتی شهرستان بندر عباس ۵۰ نمونه جمع‌آوری گردید. پس از بررسی‌های اولیه فنوتیپی و بیوشیمیایی از روش مولکولی PCR در ناحیه 16s rRNA S و تعیین توالی این ناحیه جهت شناسایی باکتری‌های جداشده استفاده گردید. پس از مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی باکتری‌های دیگر موجود در پایگاه داده‌های NCBI ژنوتیپ جدایه‌های به-دست آمده مشخص گردید.

بررسی‌ها نشان داد جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق، شباهت نوکلئوتیدی بالایی به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* و *لاکتوباسیلوس مورینوس* دارند.

در تحقیقات گذشته جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* از محصولات پنیر لیقوان (۱۶،۱۸)، پنیر سنتی موجود در استان آذربایجان غربی(۲۰)، ماست (۲۸)، پنیر چدار (۳۲،۳۳)، کاتیک (۳۴)، پنیر اسلواک برینزا (۳۵)، شیر شتر (۳۶)، کشک زرد (۲۹) و دیگر محصولات لبنی(۳۷) گزارش شده است.

وجود *لاکتوباسیلوس مورینوس* نیز توسط گروهی از محققین در محصولات لبنی تأیید شده است. این

لاکتوباسیل از محصولاتی مانند دوغ سنتی (۳۸)، ماست و پنیر مناطق هریس، سراب، اهر، ماکو و کلیبر (۳۹) جداشده است. اثرهای مثبت *لاکتوباسیلوس مورینوس* در بهبود التهاب روده در موش (۴۰) و هم‌چنین بر تجمع و بیوفیلم *اشرشیاکلی* بررسی شده است (۴۱). در پژوهش حاضر برای اولین بار *لاکتوباسیلوس مورینوس* از پنیر سنتی شهرستان بندرعباس جداسازی شده است. به نظر می‌رسد *لاکتوباسیلوس مورینوس*، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در فرآوری و کیفیت پنیرهای سنتی شهرستان بندرعباس نقش بسزایی ایفا می‌کنند.

نتیجه‌گیری

جمع‌آوری مشخصات سویه‌های بومی هر ناحیه از کشور می‌تواند علاوه‌بر حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی، اطلاعات مفید برای استفاده‌های علمی ارائه نماید. علاوه‌بر این باتوجه‌به هزینه زیادی که صرف واردات باکتری‌های آغازگر جهت تولید پنیرهای صنعتی می‌شود، با شناسایی آغازگرهای بومی وصنعتی‌سازی آن‌ها می توان از خروج ارز جلوگیری کرد. مطالعه‌های نشان می‌دهد آغازگرهای بومی توانایی تولید عطر و طعم مطلوب و مطابق با ذائقه ایرانی را دارا هستند. در تحقیق حاضر، پنیرهای سنتی شهرستان بندرعباس مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد این محصولات حاوی *لاکتوباسیلوس مورینوس*، *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هستند. این باکتری‌ها در کیفیت و مزه این پنیرها مؤثر هستند لذا می‌توان از آن‌ها به‌عنوان آغازگر در تولید پنیرهای صنعتی بهره برد.

جدول ۱- توالی و خصوصیات پرایمرها (۲۵)

Primer	Sequence
1525r (R)	5′-AAGGAGGTGWTCCARCC -3′
27f (F)	5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′

جدول۲- نتایج مورفولوژی و رشد در دماهای ۱۵،۳۰ و ۴۵ درجه سلسیوس

ردیف	شماره باکتری	مورفولوژی کلنی	۱۵°C	۳۰°C	۴۵°C
۱	L۸	محدب، سفیدرنگ، قطر حدود ۱ میلی‌متر	+	+	+
۲	L۱۴	محدب، کرم‌رنگ، قطر حدود ۱ میلی‌متر	+	+	+
۳	L۱۵	محدب، بی‌رنگ، قطر حدود ۱ میلی‌متر	+	+	+
۴	L۱۶	محدب، حاشیه صاف، سفیدرنگ، قطر حدود ۱ میلی‌متر	+	+	+
۵	L۱۷	محدب، حاشیه صاف، سفیدرنگ، قطر حدود ۱ میلی‌متر	-	+	-
۶	L۱۸	محدب، حاشیه صاف، قطر حدود ۱ میلی‌متر	+	+	+
۷	L۱۹	محدب، حاشیه صاف، سفیدرنگ قطر ۳-۴ میلی‌متر	+	+	-
۸	L۲۰	محدب، حاشیه صاف، سفیدرنگ قطر ۳-۴ میلی‌متر	+	+	+
۹	L ۳۰	محدب، حاشیه صاف، سفیدرنگ قطر ۲-۳ میلی‌متر	+	+	+
۱۰	L ۳۳	محدب، حاشیه صاف، سفیدرنگ قطر ۲-۳ میلی‌متر	+	+	+
۱۱	L ۳۵	محدب، حاشیه صاف، ریز قطر حدود ۱میلی‌متر	+	+	+

جدول ۳- تایج تست تخمیر قندها

ردیف	شماره باکتری	سوربیتول	آرابینوز	گلوکز	لاکتوز	گالاکتوز	سوکروز	مانیتول
۱	L۸	+	+	+	-	-	-	+
۲	L۱۴	+	+	+	-	-	-	-
۳	L۱۵	+	+	+	-	-	-	-
۴	L۱۶	-	-	+	-	-	-	-
۵	L۱۷	-	-	+	-	-	-	-
۶	L۱۸	+	+	+	-	-	-	-
۷	L۱۹	-	-	+	-	-	-	-
۸	L۲۰	+	+	+	-	-	-	-
۹	L ۳۰	+	+	+	-	-	-	-
۱۰	L ۳۳	+	+	+	-	-	-	-
۱۱	L ۳۵	-	+	+	-	-	-	-

منابع

1- Soleymani Fard F, Ghobadi Dana M, Piravi Vanak Z. Screening local Lactobacilli from Iran in terms of production of lactic acid and identification of superior strains. BJM. 2015;15:155-166 [Persian in text full]

2- Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited Review: The scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic. JDS. 2001; 84 (2): 319-33.

3- Ghobadi Dana M, Hatef Soleimanian A, Yakhchali B. Isolation and molecular identification of lactobacilli in some native dairy products. JRIFST.2012;2:99-116 [Persian in text full]

4- Torres-Llanez MJ, Vallejo-Cordoba B, Diaz-cinco ME, Mazorra-Manzano MA and Gonzalez-Cordova AF. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. J of Food Control. 2006; 17: 683-690.

5- Kooshki V, Vatan Doost J, Mortazavi A, Janat Abadi A, Hoseini S. Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Probiotic Bacteria from Traditional Sabzevar Dairy Products. J Sabzevar Univ Med Sci.2013;5:726-737. [Persian in text full]

6- Lee B, Bak Y. Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. JNM. 2011; 17(3): 252-66.

7- Garabal IJ, Rodriguez-Alonsa P and Acenteno J. Characteization of lactic acid bacteria isolated from raw cow's milk cheese currently produced in Galicia (NW Spain). LWT Food Sci and Technol. 2008; 41(8): 1452-1458.

8- Bouton Y., Guyot P., Grappin R., Preliminary characterization of microflora of Comté cheese. J. Appl. Microbiol. 1998;85 123–131

9- Coppola R, Nanni M, Iorizzo M, Sorrentino A, Sorrentino E, Chiavari C, Grazia L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening, Le Lait, INRA Editions, 2000, 80 (5) 479-490

10- Durlu-Ozakaya F, Xanthopoulos V, Tunail N and Litopoulou-Tzanetaki E. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewe's milk. J of Appl Microbiol. 2001; 91: 861-870

11- Beukes, EM, Bester, BH, & Moster JF. The microbiology of South African traditional fermented milks.Int. J. Food Microbiol. 2001; 63: 189-197.

12- Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK, & Holzapfel WH.Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto:The Maasai traditional fermented milk in Kenya. Int. J. Food Microbiol. 2004,94: 269-278.

13- Ayhan K , Durlu-ozkaya F, & Tunail N. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of Streptococcus thermophilus and Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus . Int. J. Dairy Technol. 2005 ; 58: 150-157.

14- Kostinek M, Specht I , Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, Mbugua S,Dortu C, Thonart P, Taljaard L, Mengu M, Franz CMAP & Holzapfel WH.Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. . Int. J. Food Microbiol. 2007;114(3): 342-351.

15- Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, Jovcic B, Savic D and Topisirovic LA. Survey of lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. . Int. J. Food Microbiol.2008; 127: 305-311.

16- Ghotbi M, Soleymaniyan ZS. and Sheikh Zeinoddin M. Identification of facultative hetrofermentive in Lighvan cheese.IFSTRJ. 2010; 6(2): 145-148. [Persian in text full]

17- Lotfi H, Hejazi MA, Maleki ZanjanI B. and Barzegari A. Isolation, Biochemical and Molecular identification of potentiallly probiotic bacteria from traditional dairy products from Heris andSarab regions. Journal of Food Industry Researchs. 2010 ;20 (1): 1- 17. [Persian in text full]

18- Hasani M, Farajniya S, Hesari J, Mosavi. 2008. Isolation and identification useful practical properties two species Lactobacillus from traditional Lighvan cheese. 18 the International congress food science and technology; 2008. Mashhad[Persian in text full]

19- Tafvizi F, Taj Abadi Ebrahimi M, Khejare L. Genotypic and phylogenetic study of lactobacilli producing bacteriosins isolated from local dairy products and traditional foods. JFUMS. 2012;2:84-90. [Persian in text full]

20- Ehsani A, Mahmoodi R, Hashemi M, Raeisi M. Isolation and identification of lactobacillus in traditional cheeses of West Azarbaijan province. Iran J Med Microbiol 2014 ; 9:38-43. [Persian in text full]

21- Ahamdi SM, Khamiri M, Khosroshahi A and Kashani Negad M. Isolation and identification of Lacic acid bacteria from Lighvan cheeses. J Agric Sci and Natural Res. 2008; 3(16): 80-91.

22- Pourahmad R, & Assadi MM.Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. Int. J. Dairy Technol. 2007; 60: 259-262

23- Izadi M, Fooladi MH, Sharifi Sirchi GH, Amini J. Isolation of Lactobacillus acidophilus from yogurt samples of Shahrbabak city and its molecular identification. JAB..2010 ; 2:1-12 [Persian in text full]

24- Winn W, S. Allen W. Janda E. Koneman G. Procop P. Schreckenberger and G. Woods Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA. 2006.

25- Wawrik B, Kerkhof L, Zylstra GJ, Kukor JJ. Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. Appl. Environ. Microbiol. 2005. 71(5):2232-8.

26- Salazar O, González I, Genilloud O. New genus-specific primers for the PCR identification of novel isolates of the genera Nocardiopsis and Saccharothrix. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002.Jul 1; 52(4):1411-21.

27- Swearingen PA, O'sullivan DJ, Warthesen JJ. Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid bacteria on Cheddar cheese quality1.JDS . 2001;84(1):50-9.

28- Ebrahimi MT, Ouweh AC, Hejazi MA, Jafari P.. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. Afr.J. Microbiol. Res. 2011; 4; 5(1):20-7

29- Tabatabaei Yazdi F, Vasiei A, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi A. Study of the diversity of lactic acid bacteria isolated from Zabaly yellow wheat (Sistani) using S rRNA16 gene amplification. FSCT2016 59:25-28. [Persian in text full]

30- Narimani T, Tarinejhad A, Hejazi M A. Isolation and identification of biochemical and molecular characteristics of Lactobacillus bacteria with probiotic potential of cow's milk and traditional yoghurt in Khoy.JFST.2015 ; 48:115-128. [Persian in text full]

31- Shi Y, Cui X, Gu S, Yan X, Li R, Xia S, Chen H, Ge J. Antioxidative and Probiotic Activities of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China. PROBIOTICS ANTIMICRO .2018; 28:1-4.

32- Valence F, Richux R, Thirry A, Palva A, Lortal L S. Autolysis of Lactobacillus helveticus and Propionibacterium freudenreichii in Swiss cheeses: first evidence by using species-specific lysis markers. J DAIRY RES. 1998; 65(4):609-20.

33- Fortina MG, Nicastro G, Carminati D, Neviani E, Manachini PL. Lactobacillus helveticus heterogeneity in natural cheese starters: the diversity in phenotypic characteristics. J. Appl. Microbiol. 1998; 84(1):72-80.

34- Tserovska L, Stefanova S, Yordanova T. Identification of lactic acid bacteria isolated from katyk, goat's milk and cheese, *J Cult Collect.* 2002; 3:48-52

35- Belicova A, Mikulasovs M, Dusinsky R. Probiotic potential and safety properties of Lactobacillus plantarum from Slovak Bryndza cheese. Biomed Res. Int. 2013;1-8

36- Abbas MM, Mahasneh AM. Isolation of Lactobacillus strains with probiotic potential from camels milk. Afr.J. Microbiol. Res. 2014;9; 8 (15):1645-55.

37- Giraffa G, Gatti M, Rossetti L, Senini L, Neviani E. Molecular diversity within Lactobacillus helveticus as revealed by genotypic characterization. AEM.2000; 66 (4):1259-65.

38- Kawthar MA, Hanan BE, Yousif F, Ahmed EE. Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Starter Dough of Sudanese Sorghum Fermented Flat Bread (Kissra). Pakistan J Nutr 2018; 17(2):57-63.

39- Hejazi MA, Mokhtari Zunuzi P, Khosroshahli M, Barzegari A, Lotfi H and Alizadeh S. Molecular identification of probiotic bacteria in traditional dairy products of Azarbaijan using 16S rRNA. J. Agric. Eng. Res.2012; 13 (3):51- 62.

40- Pan F, Zhang L, Li M, Hu Y, Zeng B, Yuan H, Zhao L, Zhang C. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti-inflammaging effects in calorie-restricted mice. . Microbiome. 2018;6(1):54.

41- Ni J, Kulkarni C, Barash E, Crissey MA, Roggiani M, Goulian M, Wu GD. Altering Nitrogen-Sensing in *E.Coli* Causes Changes in Cellular Aggregation and Biofilm Formation. Gastroenterology.2018; 31; 154(6);s642-s643

42- Holt J.G,Krieg NR,Sneath PHA,Staley JT,Williams ST. bergeys manual of determinative bacteriology, ninth edition.USA,LIPPINCOTT WILLIAMS AND WILKINS,2000