



Scan online to view this article

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

Manizheh Hajizadeh Varzeghan¹, Gholamreza Zarrini^{2*}, Farzam Sheikhzadeh Hesari²,
Mohammad Hossein Modarressi³

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



برای مشاهده این مقاله به صورت
آنلاین اسکن کنید

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

منیژه حاجی زاده ورزقان^۱، غلامرضا زرینی^{۲*}، فرزاد شیخ زاده حصاری^۲، محمد حسین مدرسی

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 پروبیوتیک ها به سرعت در حال افزایش است. پروبیوتیک ها به عنوان میکروارگانیسم های زنده ای تعریف می شوند که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند، برای فرد سودمند هستند. پروبیوتیک ها می توانند باکتری، مخمر یا کپک باشند؛ اما اکثر آن ها باکتری هستند. در میان باکتری های پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیک محبوب تر بوده و اکثر پروبیوتیک ها متعلق به این گروه می باشند. در میان باکتری های پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیک محبوب تر بوده و اکثر پروبیوتیک ها متعلق به این گروه می باشند. با توجه به تعداد بالای باکتری های پروبیوتیک در روده، به نظر می رسد پروبیوتیک ها یکی از جالب ترین نامزدها برای درمان بیماری التهابی روده^۱ (IBD) باشند. پروبیوتیک ها با افزایش مخاط، سلول های Paneth و Goblet روده را تقویت می کنند. همچنین پروبیوتیک ها باعث تعدیل میکروبیوتای روده با حفظ تعادل و سرکوب رشد باکتری های بیماری زای احتمالی در روده می شود. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی جدایه های جدید لاکتیک اسید باکتری، از لبنیات سنتی رایج منطقه ی آذربایجان (ورزقان)، با قابلیت پروبیوتیکی انسانی مناسب انجام گرفت.

مواد و روش ها: در پژوهش حاضر لاکتیک اسید باکتری های موجود در محصولات لبنی منطقه ورزقان از آذربایجان شرقی با روش های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شده و توانایی پروبیوتیکی آن ها مورد ارزیابی قرار گرفته است. سپس جدایه ها با استفاده از خصوصیات ظاهری، رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون رشد در دماهای ۱۵، ۳۷ و ۴۰ درجه سلسیوس، توانایی تخمیر در قندهای مختلف از بین جدایه های جداسازی شده روی محیط کشت اختصاصی MRS، انتخاب شده و خواص پروبیوتیکی آن ها بررسی شدند. مقاومت به اسید، نمک های صفراوی، هیدرولیز آرژنین بررسی شدند. برای شناسایی مولکولی از توالیابی ژن *16 S rRNA* استفاده شد.

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

نتیجه گیری: با توجه به نتایج بدست آمده جدایه های لاکتوباسیلی توان مناسبی برای پروبیوتیک بودن از نظر تحمل اسید و املاح صفراوی داشتند و می توانستند برای کاربرد در دستگاه گوارش بقا کافی داشته باشند. فرآورده های لبنی سنتی منطقه آذربایجان دارای استعداد مطلوبی برای جداسازی پروبیوتیک های مناسب انسانی هستند.

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

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، *Enterococcus Lactobacillus*

فرآورده لبنی سنتی، Iau Science

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 غیرتهاجمی 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 لاکتوباسیل‌ها از مواد لبنی سنتی، چندین نمونه از لبنیات سنتی منطقه آذربایجان که به‌طور

امروزه بسیاری از جنبه‌های رژیم غذایی و محصولات طبیعی، توجه دانشمندان را به خود جلب کرده‌اند. یکی از این موارد «پروبیوتیک‌ها»^۲ هستند (۱). در میان مواد غذایی کاربردی، استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌سرعت در حال گسترش است (۲). طبق تعریف FAO/WHO^۳، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده هستند، که اگر در مقادیر کافی مصرف شوند، برای افراد سودمند هستند (۳،۴). واژه پروبیوتیک از دو کلمه 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 مصرف شده‌اند (۵). مصرف مکمل‌های پروبیوتیک موجب ایجاد کلنی‌های مفیدی می‌شوند که می‌توانند مانند محیط باکتریایی طبیعی روده به‌سلامتی انسان کمک کنند و درعین حال 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 (IDF)^۴ 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

⁴ International Dairy Federation

² probiotics

³ Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization

مرسوم از بیشترین نرخ مصرف در میان مردم برخوردار بودند، جمع آوری و به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تبریز منتقل شد. سپس به منظور آماده سازی نمونه ها برای کشت، توسط محلول سرم فیزیولوژی (۹، ۰٪ نمک NaCl) استریل، رقت های 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} ، از نمونه ها تهیه شد. به این صورت که برای تهیه در رقت 10^{-1} ، از ماده لبنی جامد ۱ گرم و از ماده لبنی مایع ۱ میلی لیتر، در ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی توسط دستگاه ورتکس به طور کامل سوسپانس شد.

کشت سوسپانسیون میکروبی

محیط کشت اختصاصی برای رشد لاکتوباسیل ها، محیط MRS^۵ اگر (جامد) و MSR برات (مایع) است. در این مرحله از کشت به دلیل نیاز به ظهور کلنی ها و بررسی مورفولوژی آن ها، از محیط جامد استفاده شد. پلیت های تلقیح شده، به مدت ۴۸ ساعت در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. لازم به ذکر است که به دلیل بی هوازی بودن لاکتوباسیل ها، همه کشت های باکتریایی قبل از انتقال به گرم خانه در داخل جار بی هوازی شمع قرار داده شدند. بررسی مورفولوژی کلنی ها، اولین قدم از شناسایی است. پس از ظهور کلنی ها، شکل و خصوصیات ظاهری آن ها زیر لوپ بررسی شد. پس از بررسی میکروسکوپی کلنی ها، به منظور مشاهده و بررسی مورفولوژی باکتری های تشکیل دهنده کلنی، از رنگ آمیزی گرم استفاده شد. سپس لام تهیه شده زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. به منظور جداسازی اولیه، پس از شناسایی کلنی های باکتری های مورد نظر، از این کلنی ها بر روی محیط کشت MRS اگر کشت خالص انجام گرفت. پس از ۴۸ ساعت

رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، خلوص کلونی های ظاهر شده توسط رنگ آمیزی گرم تأیید شد. به دلیل کاتالاز منفی بودن لاکتوباسیل ها، 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، حباب های گاز ظاهر می شود.

شناسایی اولیه باکتری ها تست های بیوشیمیایی

تست های لازم برای این سطح مطابق طبقه بندی کتاب "برجی" شامل تست VP^۶، تست هیدرولیز آرژنین، تست تخمیر کربوهیدرات ها، 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 دقیق تر، از روش PCR استفاده شد. برای شناسایی مولکولی لاکتوباسیل های برگزیده ی این پروژه، با تمرکز بر تکثیر و توالی یابی ژن 16S rRNA، از روش PCR و بررسی نتایج با روش الکتروفورز ژل اگرز استفاده شد. از پرایمرهای عمومی زیر برای این PCR استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

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

^۶ Voges Proskauer Test

^۵ De Man, Rogosa and Sharpe

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 /شریشیا کلی^۷، کلبسیلا پنومونیه^۸، باسیلوس سوبتیلیس^۹، استافیلوکوکوس اورئوس^{۱۰} و کاندیدا/کفیر^{۱۱} 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 پیت 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 سانیکراد 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.

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 جدایه‌ها 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 فالدون های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی محیط مایع تلقیح شده و کشت‌ها در گرم‌خانه‌ی شیک دار ۳۷ °C گرماگذاری شدند.

آزمون مقاومت به اسید

محیط MRS براث تهیه کرده، سپس یک ارلن کوچک حاوی آب مقطر اتوکلاو کرده و با پیت 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 ۱۰۰ μl 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 ۵۰ μl 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

¹⁰ Staphylococcus aureus

¹¹ Candida kefyr

⁷ Escherichia coli

⁸ Klebsiella pneumonia

⁹ Bacillus subtilis

جداسازی سوپرناتانت

متابولیت‌های باکتریایی طی کشت یک‌شبه به محیط کشت آزاد می‌شوند. برای جداسازی این متابولیت‌ها، محیط موجود در فالكون‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاوی متابولیت‌ها از رسوب باکتریایی جدا شده 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^{۱۲} زردرنگ است، جذب میتوکندری سلول‌های فعال از نظر متابولیک شده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، تولید بلور فورمازان^{۱۳} بنفش‌رنگ می‌کند که در حلال مناسب حل شده 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 پلیت‌های تخلیه و به هر چاهک ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (حلال مناسب بلورهای فورمازان) اضافه شد و پیتاژ 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 الیزا 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 ظاهر شده

پس از گرماگذاری کشت‌ها، کلنی میکروارگانیسم‌های موجود در ماده لبنی روی محیط ظاهر شد. تهیه لام از کلنی‌های 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

¹³ Formazan

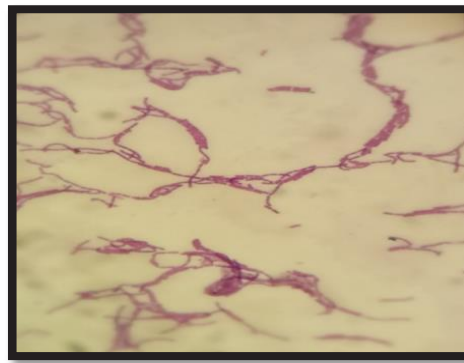
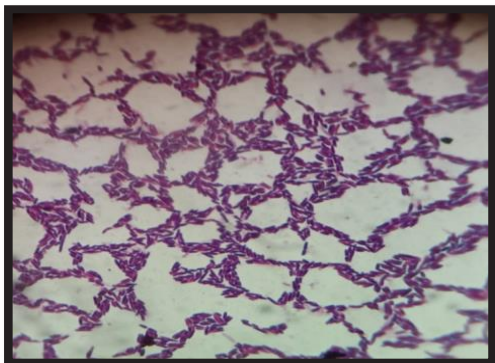
¹² Tetrazole

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

نتایج جداسازی

طی این مطالعه، به طور کلی در مجموع مواد لبنی ۱۳ جدایه جداسازی و کدگذاری شد (جدول ۳). از همه ی لاکتیک اسید باکتری ها جداسازی شده کشت خالص انجام گرفت سپس نتایج شناسایی جدایه ها در سطح گونه با انجام

تست های بیوشیمیایی به صورت زیر حاصل شد که هر ۱۳ جدایه مورد بررسی در این تست، VP^- (ناجور تخمیر) بودند و همه ی جدایه های ناجور تخمیر اجباری مورد بررسی در این تست، Arg^+ بودند. پس از مشخص شدن دسته بندی هر یک از جدایه ها تست تخمیر سایر کربوهیدرات ها طبق کتاب برجی برای هر دسته انجام شد. تست تخمیر کربوهیدرات با ترکیبات قندی مختلف برای جدایه های CA1، YN1، MS1، MV1، CA1، YN3، MV2، MA1، YN4، CV2، CA1، YA1 MV2، YN3، MV2، MA1 استفاده شد (جدول ۴).



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

جدول ۳: جدایه های لاکتیک اسید باکتری های شناسایی شده

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

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

جدول ۴: نتایج تخمیر کربوهیدرات ها توسط لاکتیک اسید باکتری ها

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

نتایج رشد در دماهای مختلف

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 $\text{pH} = 4$ به مدت ۳ و ۴ ساعت زنده ماندند و تعداد کلنی‌های شمارش شده آن‌ها مطابق دستورالعمل سازمان ملی استاندارد به تعداد 10^6 رسیده بودند (جدول ۵).

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 در دمای 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

جدول ۵: نتایج آزمون مقاومت به اسید

ردیف	جدایه	تعداد کلنی‌ها در لحظه‌ی صفر	تعداد کلنی‌ها بعد ۳h
۱	MA1	$> 10^6$	۲۰۰
۲	MV2	$> 10^6$	۸۵
۳	YN3	$> 10^6$	عدم رشد
۴	YN1	$> 10^6$	۳۰۰
۵	MV2	۵۰	عدم رشد
۶	CV1	$> 10^6$	$> 10^6$
۷	CV2	$> 10^6$	۲۰۰
۸	YM4	$> 10^6$	$> 10^6$
۹	CA1	$> 10^6$	$> 10^6$
۱۰	MV1	$> 10^6$	۲۲۰
۱۱	MS1	$> 10^6$	۲۰۰
۱۲	YN1	$> 10^6$	۳۰۰
۱۳	CR1	$> 10^6$	۲۴۰

نتایج آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی

جذب نوری اولیه‌ی تقریباً 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 (جدول ۶).

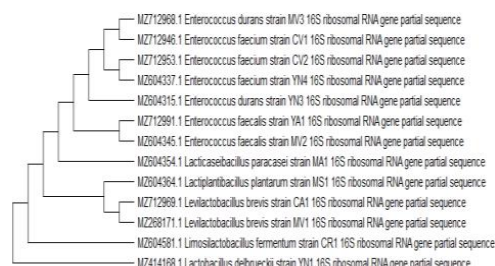
مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفراوی براساس مقایسه‌ی دو پارامتر اندازه‌گیری شد که شامل تاخیر در رشد سویه‌ها به دلیل اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی و اندازه‌گیری رشد سویه‌ها می‌باشد. هر سویه در محیط کشت MRS مایع بدون نمک‌های صفراوی (کنترل) و محیط کشت مایع دارای ۰/۳ درصد نمک‌های صفراوی تلقیح شد و توانایی رشد، با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر در فاصله زمانی نیم ساعت کنترل شد. رسم منحنی رشد با

جدول ۶: نتایج آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی

ردیف	جدایه	تعداد کلنی‌ها در لحظه‌ی صفر	تعداد کلنی‌ها بعد ۳h
۱	MA1	$> 10^6$	۲۰۰
۲	MV2	$> 10^6$	۱۵۰
۳	YN3	$> 10^6$	۲۱۰
۴	YN1	$> 10^6$	۲۸۰
۵	MV2	۲۰	۱۸۰
۶	CV1	$> 10^6$	$> 10^6$
۷	CV2	$> 10^6$	۱۵۰
۸	YM4	$> 10^6$	۲۰۰
۹	CA1	$> 10^6$	۱۵۰
۱۰	MV1	$> 10^6$	۱۸۰
۱۱	MS1	$> 10^6$	۱۰۰
۱۲	YN1	$> 10^6$	۳۰۰
۱۳	CR1	$> 10^6$	۱۵۰

نتایج ارزیابی اثرات ضد میکروبی

در ادامه این پژوهش برای بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره جدایه ها، طیفی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌های /شریشیا 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 باکتری‌های /شریشیا 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



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

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) انجام گرفته 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).

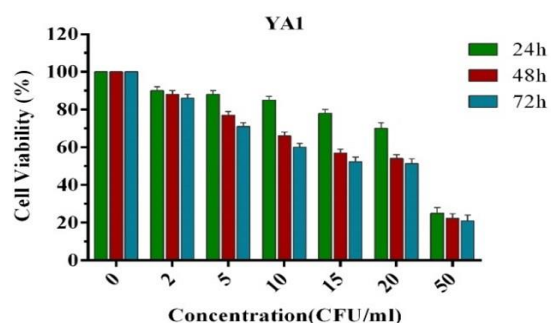
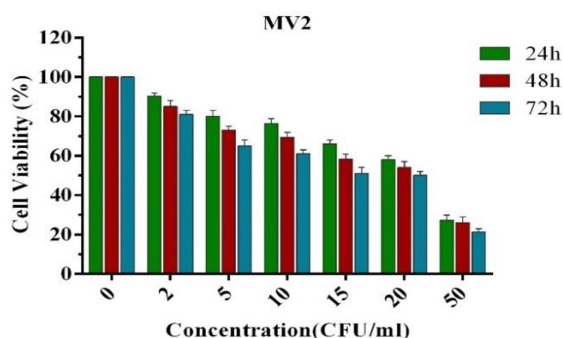
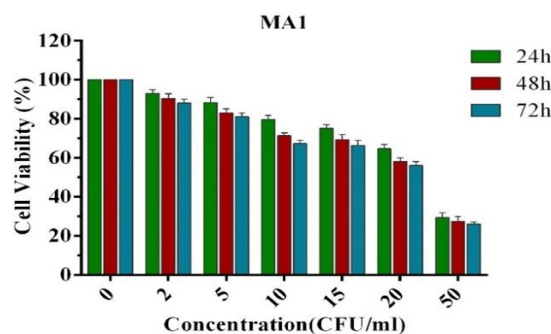
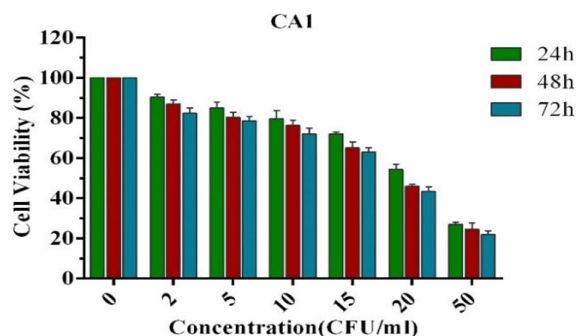
نتایج بررسی سمیت سلولی (MTT)

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 سلول‌های 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 می‌باشند.

به منظور بررسی اثرات سمیت جدایه‌های گرفته شده بر روی سلول‌های نرمال و تعیین غلظت IC₅₀ (غلظتی از دارو که موجب مهار رشد در ۵۰ درصد از سلول‌ها می‌شود) برای هر کدام از آنها، از تست MTT استفاده شد. بدین منظور مقدار ۱۰^۴ 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. ضمناً 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 الیزا ریدر خوانده شد و درصد بقاء برای هر غلظت در زمان

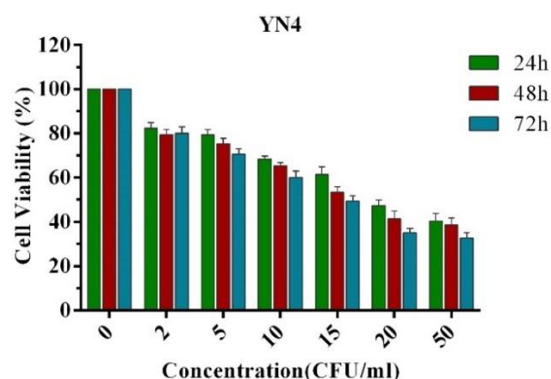
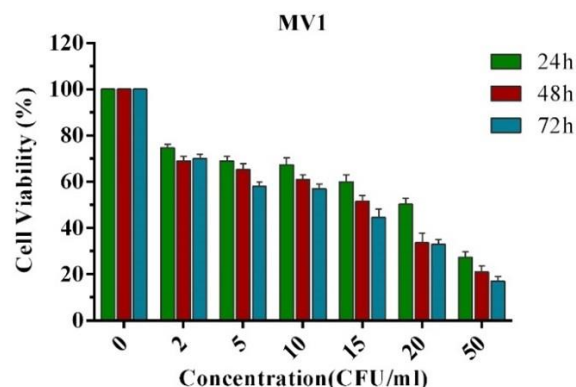
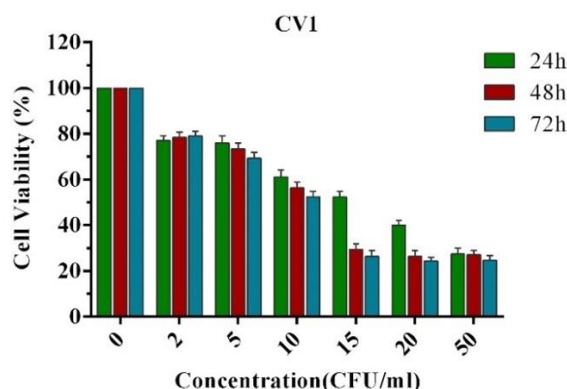
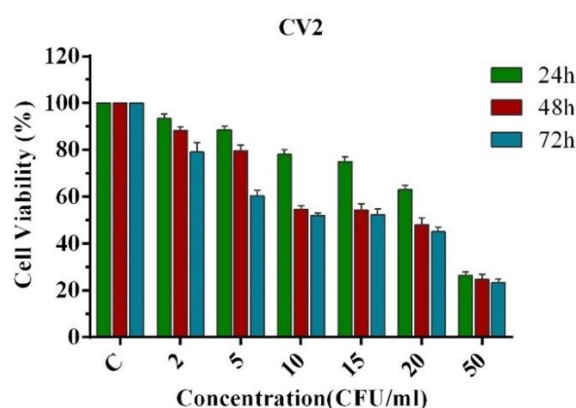
جدول ۷: نتایج ارزیابی اثرات ضد میکروبی جدایه‌ها بر حسب قطر هاله عدم رشد (اندازه هاله‌ها بر حسب میلی متر)

ردیف	جدایه	اثریشیا 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



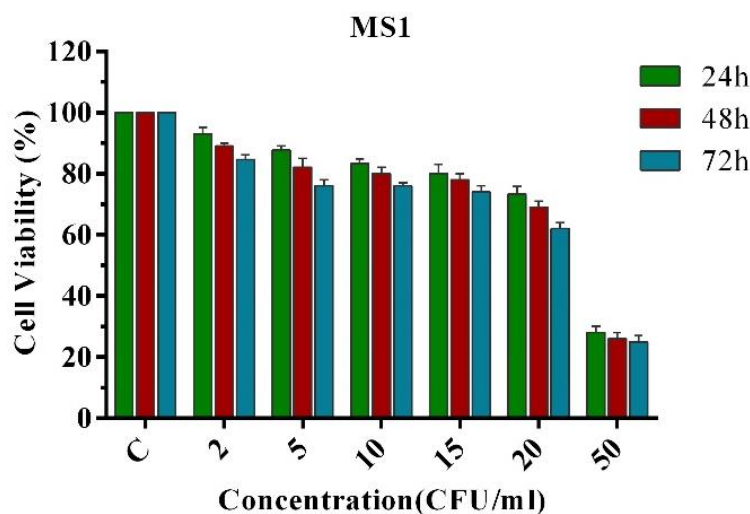
دو جدایه CA1 و MA1 در مقایسه با دو جدایه دیگر تا غلظت 20 CFU/ml بیشتر از 60 درصد سلول‌ها زنده و فعال هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل $\pm$ انحراف معیار (SD) می‌باشد

شکل ۳. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های CA1، MA1، MV2، YA1 با تست MTT. بر روی رده‌ی سلولی HFF2 با غلظت‌های مختلف (50 تا 0 CFU/ml)، در زمان‌های تیماری ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت که نشان می‌دهد در



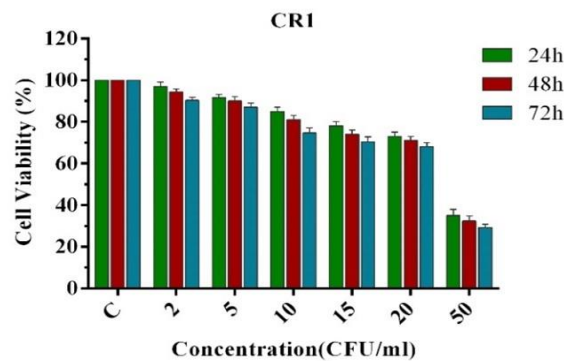
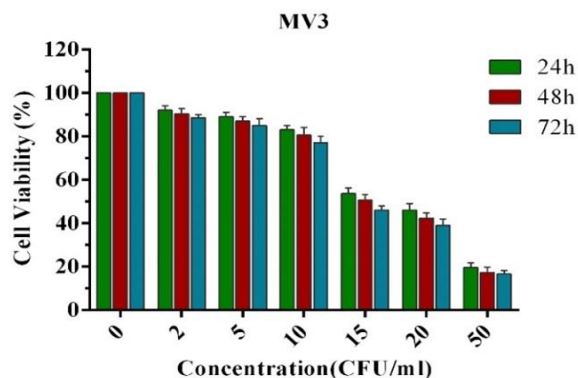
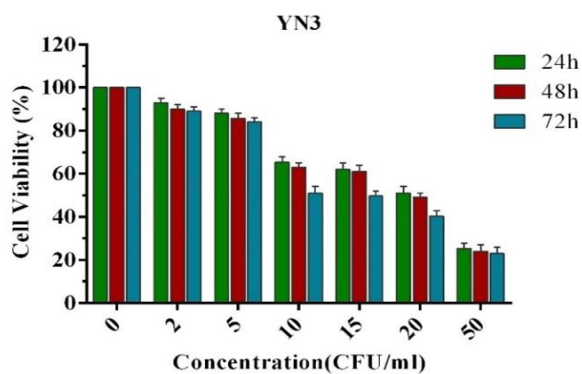
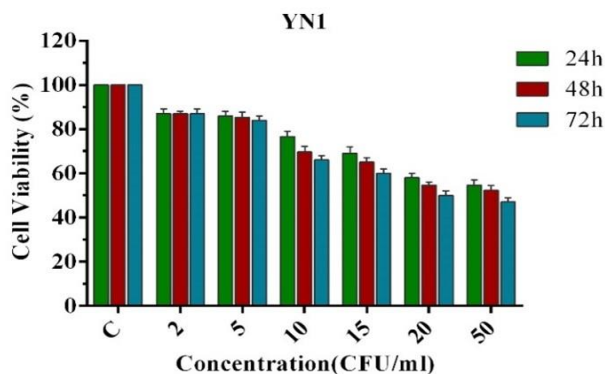
شکل ۴. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه های CV2, CV1, MV1, YN4 با تست MTT. بر روی رده سلولی HFF2 با غلظت های مختلف (۵۰ CFU/ml تا ۰)، در زمان های تیماری ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت که نشان می دهد

تا غلظت ۱۰ CFU/ml در هر چهار جدایه بیشتر از ۵۰ درصد سلول ها زنده و فعال هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل $\pm$ انحراف معیار (SD) می باشد.



شکل ۵. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه های MS1 با تست MTT. بر روی رده سلولی HFF2 با غلظت های مختلف (۵۰ CFU/ml تا ۰)، در زمان های تیماری ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت، که نشان می دهد تا غلظت تیماری ۲۰ CFU/ml

تقریباً ۷۰ درصد سلول ها فعال هستند. مقادیر ارائه شده در نمودار به صورت میانگین سه بار تکرار مستقل $\pm$ انحراف معیار (SD) می باشد.



شکل ۶. بررسی اثر سایتوتوکسیک جدایه‌های YN1, YN3, MV3, CR1 با تست MTT. بر روی رده سلولی HFF2 با غلظت‌های مختلف (۵۰ CFU/ml تا ۰)، در زمان‌های تیماری ۷۲، 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 $\pm$ انحراف معیار (SD) می‌باشد

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

(CFU/ml) جدایه IC_{50}	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. بنابراین جداسازی و استفاده از این باکتری‌ها به عنوان استارتر به

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 $PH = 4$ 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 بر این، 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، میکرواورگانیزم‌های مورد آزمایش لزوماً نباید در معرض PH معده قرار بگیرند (۱۶). با توجه به اینکه تحمل محیط اسیدی معده، تنها یکی از ویژگی‌های میکرواورگانیزم‌های 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 میکرواورگانیزم‌های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینت سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارشی رساند. در این زمینه یا مطالعه-ای که Kim و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ انجام دادند، نشان دادند که میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم به طور موثر میکرواورگانیزم 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 $PH = 4$ 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

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 باکتر-هایی 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 کلومیا انجام دادند. در این تحقیق از روش‌های تست مقاومت به اسید، داشتن فعالیت انتاگونیستی بر علیه *Salmonella*^{۱۴} 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^{۱۵} و *Streptococcus thermophilus*^{۱۶} 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 *Enterococcus durans* MV3 *paracasei* MA1 *Enterococcus* *Enterococcus durans* YN3 *Enterococcus faecalis* MV2 *faecalis* YA1 *Enterococcus* *Enterococcus faecium* CV1

Enterococcus faecium YN4 *faecium* CV2 *Lactobacillus brevis* *Lactobacillus brevis* CA1 *Lactobacillus* *Lactobacillus acidipiscis* MV1 *Lactobacillus plantarum* MS1 *fermentum* CR1 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 *شریشیاکلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *کاندیدا* کفیر دارند. این گونه‌ها هیچ فعالیت ضد میکروبی نسبت به گونه‌های گرم مثبت نشان ندادند. گونه-های 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 durans* 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. *Enterococcus* *Lactobacillus paracasei* و *durans* 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 سایکوتوکسیک 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 سایکوتوکسیک نمونه‌ها فقط

¹⁶ *Streptococcus thermophilus*

¹⁴ *Salmonella*

¹⁵ *Lactobacillus delbrueckii*

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

وابسته به غلظت است). در توجیه این نتایج می توان گفت
اثر سایتوتوکسیک این سویه های جدا شده مورد بررسی
بصورت آنی بوده و برای تاثیر بیشتر نیاز به گذر زمان نیست.
به عبارت دیگر، با گذشت زمان، جدایه های مورد بررسی
تجزیه شده و توسط سلول ها دستخوش تغییر می شوند. از
بعد درمانی این مسئله از نظر کاهش زمان درمان و هم-
چنین کاهش اثرات جانبی با گذشت زمان می تواند بسیار
قابل توجه باشد.

نتیجه گیری

در این تحقیق باکتری های *Lactobacillus paracasei*
Enterococcus durans MV3، MA1

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 Bobby 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 Bobby 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 Llum 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 *Bifidobacterium* Strains 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 *Lactobacillus* Strains from Fermented Sausages for Their Potential Use as Probiotics. *Meat Science*, 2004; 67: 309- 317.

19. Ayele N, Siv A, Goran M. Randomly 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.

