جداسازی، شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از ماست‌های محلی شهرستان بناب

مرتضی مهاجری امیری[1]*

[1] گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۱۱

چکیده

اهمیت پروبیوتیک‌ها در ایجاد تعادل در میکروبیوتا، تنظیم عملکرد سیستم ایمنی، جلوگیری از بروز و عود بیماری‌های عفونی، بهبود اختلالات گوارشی و بسیاری از مزایای دیگر به اثبات رسیده است. بررسی‌ها در محصولات تخمیری سنتی و محلی باعث جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک در جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم* و *استرپتوکوکوس* شده است که معمولاً به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند. در این مطالعه از سه ماست محلی مربوط به شهرستان بناب برای جداسازی پروبیوتیک‌ها استفاده شد. خواص پروبیوتیکی از جمله: مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، هیدرولیز کلسترول و املاح‌صفراوی، خاصیت ضدمیکروبی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خودتجمعی و تجمیع مشترک مورد مطالعه قرارگرفتند و در نهایت جدایه‌های منتخب برای شناسایی مولکولی ارزیابی شدند. از این سه محصول، ۱۱ جدایه بررسی شدند، که ۷ جدایه به *لاکتوباسیلوس*‌ها و ۴ جدایه به *استرپتوکوک*‌ها تعلق داشتند. اکثر جدایه‌ها در دو یا سه خصوصیت دارای پتانسیل پروبیوتیک بودند، ولی در این میان، ۲ جدایه نتایج بهتری در اکثر تست‌های ارزیابی پروبیوتیک‌ها نشان دادند. این جدایه‌ها با استفاده از PCR برای بررسی 16S rRNA مورد ارزیابی قرارگرفتند. پس از توالی‌یابی و بررسی توالی‌ها مشخص شد که یک جدایه به *لاکتوباسیلوس کازئی* و جدایه دیگر به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با تشابه بیش از ۹۹ درصد تعلق دارند. این مطالعه تأیید می‌کند که محصولات لبنی سنتی منبع مهمی برای جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. بنا بر این شناسایی و بهینه‌سازی جدایه‌های بومی که در اکثر بررسی‌ها، پتانسیل پروبیوتیکی بهتری دارند می‌تواند مسیر را برای تولید مکمل‌ها و محصولات پروبیوتیک جدید، هموار کند.

کلمات کلیدی: باکتری پروبیوتیک، محصولات سنتی تخمیری، *لاکتوباسیلوس*، *استرپتوکوک*، 16S rRNA

* biotechmm2016@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مقدمه

اثربخشی پروبیوتیک‌ها بر سلامت انسان، موجب شده است که این میکروارگانسیم‌ها به عنوان مکمل غذایی و دارویی مورد توجه پژوهشگران حوزه سلامت قرار گیرند(۱). بهبود عملکرد سیستم ایمنی، ایجاد تعادل درمیکروبیوتا، جلوگیری از بروز و عود بیماری‌های عفونی و اختلالات گوارشی، تنظیم شرایط التهابی، کاهش اثرات عدم تحمل لاکتوز و جلوگیری از سرطان کولورکتال از خصوصیات پروبیوتیک‌ها هستند؛که در مطالعات متعددی بررسی شده‌اند(۲). همچنین؛ پروبیوتیک‌ها نقش ارزنده ای در درمان آلرژی و اگزما، تنظیم چربی‌خون و کنترل وزن دارند(۳, ۴). این میکروارگانیسم‌های تخمیری در روده زنده می‌مانند و با روش‌های متعددی به نفع میزبان عمل می‌کنند. مکانیسم‌های اساسی عملکردی پروبیوتیک‌ها شامل: تقویت سد مخاطی روده، افزایش چسبندگی به سلول‌های روده‌ای، حذف رقابتی پاتوژن‌های مختلف، ترشح ترکیبات ضد میکروبی، نقش اساسی در ایجاد محورهای روده- مغز و روده-پوست و همچنین تقویت پاسخ‌های ایمنی است. این اعمال با وجود مولکول‌های واسطه‌ای فعال مانند: اگزوپلی‌ساکاریدها، استیل کولین، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اسیدγ -آمینو بوتیریک و سروتونین انجام می‌گیرند(۵).

باکتری‌های اسید لاکتیک(LAB) مانند: *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم*، *لاکتوکوکوس* و *استرپتوکوکوس* معمولاً به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می‌شوند(۶). مطالعات بسیاری بر یافتن سویه‌های جدید پروبیوتیک و بررسی بیشتر طریقه عملکرد آنها معطوف شده است. یکی از مشهورترین پروبیوتیک‌های تخمیرکننده اسید لاکتیک، *لاکتوباسیلوس*‌ها هستند که به طور سنتی در تخمیر سبزیجات، گوشت و خصوصاً لبنیات استفاده می‌شوند.گونه‌هایی از این میکروارگانیسم‌ها، به همراه *استرپتوکوکوس‌ها* در محصولات تخمیری سنتی به وفور یافت می‌شوند(۷).

به علت اینکه خواص مرتبط با سلامتی محصولات تخمیری سنتی مشخص شده است؛ در این مطالعه از ماست های محلی شهرستان بناب به عنوان منبع جداسازی پروبیوتیک‌ها استفاده شد. خصوصیات پروبیوتیکی مانند: مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراوی، هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی، خاصیت ضدمیکروبی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خود تجمعی و تجمیع مشترک مورد بررسی قرارگرفت و در نهایت جدایه‌های منتخب برای شناسایی مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه‌ها و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

سه نمونه از ماست‌های محلی از اطراف شهر بناب جمع‌آوری شدند و در یک جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی و شناسایی پروبیوتیک‌های بالقوه و ارزیابی آن‌ها انجام شد.

نمونه‌ها با استفاده از آب پپتون ۱ درصد (شرکت سیگما، آمریکا) رقیق شدند. تکنیک pour-plate با استفاده از محیط MRS Agar (شرکت مرک، آلمان) و M17 Agar (شرکت مرک، آلمان) انجام شد و پلیت ها به صورت بی‌هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ h ساعت در انکوباتور گرماگذاری شدند. سه سری از هر کلنی ایزوله گرم مثبت و کاتالاز منفی در MRS Broth یا M17 Broth کشت داده شد و سپس با استفاده از ترکیب(۵۰ mL سرم فیزیولوژی:۵۰ mL گلیسرول) جدایه‌ها ذخیره سازی شدند. نمونه‌های ذخیره در دمای ۸۰- °C نگهداری شدند. فعال سازی جدایه‌ها با کشت دادن آن‌ها در دمای ۳۷ °C پیش از بررسی ویژگی‌های پروبیوتیک انجام شد.

محیط کشت رشد یافته در دور ۵۰۰۰×g به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد، پس از خالی کردن مایع رویی، رسوب با بافر فسفات (PBS) ۰/۱M (pH=7) شستشو داده شد، پس از

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

سانتریفیوژ و خالی کردن مایع رویی، سوسپانسیون با بافر فسفات به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد.

بررسی های بیوشیمیایی

جدایه‌ها جهت رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز بررسی شدند و در غلظتهای ۶ و ۶.۵ درصد کلریدسدیم در محیط کشت MRS Broth و M17 Broth در دماهای ^{o}C ۳۴، ^{o}C ۳۹ و ^{o}C ۵۴ کشت داده شدند(۸).

جدایه‌ها جهت تخمیرکربوهیدرات‌ها طبق روش هاریگان و مک‌کانس بررسی گردیدند(۹). محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوگز و عصارهٔ گوشت و با افزودن فنل قرمز تهیه گردید. همهٔ قندها شامل:گلوکز، فروکتوز،گالاکتوز، لاکتوز، اینوزیتول، ترهالوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکارز و سلوبیوز به صورت محلول استوک ۴ درصد تهیه و به وسیلهٔ یک فیلتر غشایی ۰.۴۵ µm استریل شدند. سپس mL ۴.۵ از محلول قندهای استریل به mL ۴.۵ محیط کشت پایه افزوده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای ^{o}C ۳۷ و به مدت h ۲۴ کشت داده شدند و µL ۵۰ از کشت فعال به محیط دارای قندهای اختصاصی تلقیح و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دیر رشد تا ۷ روز برای بررسی در ^{o}C ۳۷ نگاه داشته شدند(۹).

روش آزمون مقاومت به اسید

میزان µL ۱۰۰ از سوسپانسیون میکروبی را در تعداد مناسب لوله‌های حاوی mL ۱۰ محیط کشت مایع مناسب با پایه MRS Broth که اسیدیته آنها بوسیله اسید کلریدریک در دو pH ۴ و ۲/۵ تنظیم شده بود کشت داده شد و در دمای ^{o}C ۳۷ گرماگذاری شد. پس از گذشت h ۳ و h ۴ از گرماگذاری در انکوباتور ^{o}C ۳۷، از محیط های کشت مایع ذکر شده، mL ۱ برداشته و در محیط کشت MRS Agar تلقیح شد و به مدت h ۴۸ در دمای ^{o}C ۳۷ قرار داده شد. سپس طبق روش pour-plate تعداد میکروارگانیسم ها شمارش شدند.

مقاومت به شیره معده (پپسین، تریپسین)

از سوسپانسیون میکروبی به میزان ۲ درصد در هر یک از محیط‌های اسید مصنوعی معده و محیط‌های کنترل مخلوط شده و در دمای ^{o}C ۳۷ گرماگذاری شد. در زمان های صفر، یک، دو، سه، چهار و ۲۴ ساعت پس از گرماگذاری، mL ۱ از هر محیط تلقیح شده برداشته و پس از تهیه رقت‌های مناسب با رقیق کننده آب پپتونه ۰/۱ درصد به روش پورپلیت در محیط کشت MRS Agar یا M17 Agar کشت داده شد و به مدت h ۴۸ تا h ۷۲ در دمای ^{o}C ۳۷ گرماگذاری شد. در نهایت تعداد میکروارگانیسم‌ها شمارش شد.

مقاومت به نمک های صفراوی

میزان µL ۱۰۰ از سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت مایع حاوی عصاره صفرا و محیط کشت مایع فاقد صفرا(به عنوان بلانک) اضافه شد. جذب نوری محیط‌ها قبل از گرماگذاری در طول موج nm ۶۰۰ تا nm ۶۵۰ اندازه‌گیری شد. محیط‌ها به مدت h ۸ در دمای ^{o}C ۳۷ گرماگذاری شدند. جذب نوری محیط‌ها مجدداً پس از پایان گرماگذاری در طول موج nm ۶۰۰ تا nm ۶۵۰ اندازه‌گیری شد. میزان مقاومت میکروارگانیسم نسبت به صفرا از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\mathrm{Cinh} = \frac{(T8-T0)\mathrm{Control} - (T8-T0)\mathrm{Treatment}}{(T8-T0)\mathrm{Control}}$$

که در آن C_{inh} ضریب بازدارندگی، T_8 Control جذب نوری در محیط کشت بدون صفرا پس از h ۸ ساعت گرما گذاری، T_0 Control جذب نوری در محیط کشت بدون بایل قبل از گرماگذاری و T_8 Treatment جذب نوری در محیط کشت حاوی صفرا پس از h۸ گرماگذاری و T_0 Treatment جذب نوری در محیط کشت حاوی صفرا قبل از گرماگذاری است. ضریب بازدارندگی(C_{inh}) باید مساوی یا کمتر از ۰/۴ باشد.

فعالیت هیدرولیز کلسترول و نمک های صفراوی

برای تعیین فعالیت هیدرولیز کلسترول و نمک های صفراوی، اسیدهای آمینه آزاد شده از نمک های صفراوی مزدوج شامل: mmol/L ۶.۰ گلیکوکولات سدیم، mmol/L ۶.۰

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

سدیم تائوروکولات یا مخلوط نمک صفراوی مزدوج حاوی ۶.۰ mmol/L اسید گلیکوکولیک، اسید گلیکوشنودوکسی کولیک، اسید تائوروکولیک و اسید تائورودئوکسی کولیک با استفاده از نین هیدرین در جذب ۵۷۰nm شناسایی شدند.

آزمون خود تجمعی(Auto-aggregation)

آزمون خود تجمعی (اتو اگریگیشن) کشت‌های فعال بر اساس روش Gao و همکاران (۲۰۲۱)(۱۰) انجام شد و جذب در nm ۶۰۰ در فواصل زمانی ۰، ۴ و ۲۴ ساعت ثبت شد. همچنین اتصال باکتری‌ها به هم با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری بررسی شد. درصد خود تجمعی بر اساس معادله زیر تخمین زده شد:

$$\text{Auto} - \text{aggregation}(\%) = (1 - \frac{\text{At}}{\text{A0}}) \times 100$$

که در آن «At» جذب در زمان «t» و «A_0» جذب در زمان ۰ است.

اندازه گیری میزان آبگریزی

میزان آبگریزی میکروارگانیسم مورد نظر با استفاده از روش Ayyash و همکاران(۲۰۱۸)(۷)؛ با استفاده از hexadecane ، xylene و یا octane (مرک، آلمان) انجام شد. محیط کشت مایع MRS Broth ۲۴ h در دور ۵۰۰۰×g و به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد. رسوب به وسیله ی بافر فسفات پتاسیم شستشو و پس از انحلال مجدد در ۵ mL از همین بافر، جذب نوری آن در nm ۶۰۰ اندازه گیری شد. پس از اضافه کردن ۱ mL xylene به محلول، به مدت ۲ min مخلوط شد تا فازها از هم جدا شوند. سپس فاز آبی رویی را جدا کرده و جذب آن در nm ۶۰۰ اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد آبگریزی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Hydrophobicity}(\%) = (\frac{\text{A} - \text{A0}}{\text{A}}) \times 100$$

که در آن، A جذب نوری در nm ۶۰۰ و A_0 جذب نهائی است.

چسبندگی به سلول های اپیتلیال روده ای رده Caco-2

برای تعیین توانایی چسبندگی، سلول‌های Caco-2 بر روی پلیت کشت بافت ۲۴ خانه با غلظت 10^5 سلول در چاهک کشت داده شدند و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ h در اتمسفر ۵ درصد CO2 گرماگذاری شدند. سلول‌های جدا شده از کشت‌های ۲۴ h دو بار با بافر فسفات سالین شستشو شدند و سپس در محیط کشت DMEM High Glucose (شرکت ایده زیست نوترکیب، ایران) بدون مکمل با غلظت 10^7CFU/mL تا 10^8 مجدداً تلقیح شدند. سوسپانسیون‌های باکتریایی به سلول های تک‌لایه Caco-2 اضافه شدند. پس از ۲ h گرماگذاری در دمای ۳۷°C در اتمسفر ۵ درصد CO2 چاهک‌ها سه بار با PBS شسته شدند تا سوسپانسیون‌های باکتریایی و سلول‌های غیرچسبنده حذف شوند و سپس با ۱ درصد Triton X-100 (سیگما آلدریچ، ایالات متحده) تیمار شدند. شمارش نهایی سلول های LAB زنده (LAB چسبنده) در محیط MRS Agar به روش pour-plate انجام شد.

برای بررسی چسبندگی به سلول‌های Caco-2، جدایه‌های فعال شده سانتریفیوژ و دو بار با استفاده از نمک فسفات بافر شسته شدند و خاصیت چسبندگی بر اساس روش Alameri و همکاران (۲۰۲۲) اندازه‌گیری شد(۱۱) و بر اساس معادله زیر به صورت درصد محاسبه شد:

$$\text{Adhesin ability}(\%) = (\frac{\text{At}}{\text{A0}}) \times 100$$

که در آن "At" شماره سلول (log CFU/mL) پس از انکوباسیون و "A_0" شماره سلول اولیه (log CFU/mL) است.

تجمیع مشترک (Co-aggregation)

تجمیع‌مشترک یا هم‌انباشتگی جدایه‌ها با استفاده از سه پاتوژن *اشریشیا کلی* ATCC13706 ، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1826 و *لیستریا مونوسیتوژنز* PTCC 1299) انجام شد(مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ایران). بدین منظور نمونه مورد بررسی به مدت ۲۴ h ساعت در دمای ۳۷°C در محیط MRS Broth کشت بی‌هوازی داده شد به طور همزمان، کشت ۲۴ h ساعته از گونه‌های پاتوژن

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

ذکر شده آماده شد. نمونه‌های مورد آزمایش و گونه‌های بیماری زا به مدت ۵ min دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شده و توسط بافر فسفات شستشو داده شدند. مایع رویی خارج شد و از رسوب باقیمانده توسط بافر فسفات، سوسپانسیون تهیه شد. این سوسپانسیون در طول موج ۶۶۰ nm دارای OD مساوی ۴ بود. به حجم مساوی از نمونه مورد آزمایش و نمونه گونه‌های بیماری زا با یکدیگر مخلوط و به مدت ۴ h در ۳۷°C گرماگذاری شدند. پس از این مدت، هر لوله اپندورف حاوی مخلوط نمونه آزمایشی و عامل بیماری‌زا سانتریفیوژ شد. مایع رویی از نظر میزان جذب نوری در طول موج ۶۶۰ nm بررسی شده و میزان تجمع یافتن بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{Co} - \text{aggregation}(\%) = (1 - \frac{\text{At}}{\text{A0}}) \times 100$$

که در آن "At" جذب در زمان "t" و "A_0" جذب در زمان ۰ است(۱۲).

بررسی خاصیت ضد میکروبی

جدایه‌های مورد بررسی در برابر پاتوژن‌ها جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی مورد بررسی قرار گرفت. سویه های پاتوژن مورد بررسی شامل: *اشریشیا کلی* ATCC 13706 ، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1826 ، *لیستریا مونوسیتوژنز*PTCC1299، *انتروکوکوس فکالیس* ATCC33186، *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC1690 و *سالمونلا پارا تیفی* ATCC 9150 بودند(مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ایران). با استفاده از روش چاهک گذاری این خاصیت مورد ارزیابی قرار گرفت. دو میکرولیتر از کشت ۲۴ h جدایه کاندید پروبیوتیک به صورت یک چاهک روی سطح پلیت MRS Agar تلقیح شد. پلیت ها به مدت ۳۰ min دقیقه در دمای اتاق خشک شدند و سپس به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. از طرف دیگر هر باکتری پاتوژن با استفاده کشت شبانه در محیط Nutrient Broth (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ °C کشت داده شد و با استفاده از نیم مک فارلند به میزان 10^6 CFU/mL استاندارد شد. پس از رشد میکروارگانیسم لاکتیک بر روی پلیت‌های رشد کرده هر پلیت با مخلوط حجم mL ۱۰ محیط Mueller Hinton Agar (مرک، آلمان) و µL ۱۰۰ از هر باکتری پاتوژن پوشیده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h به صورت هوازی در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. مناطق بازدارنده ایجاد شده در اطراف چاهک‌های حاوی جدایه های پروبیوتیک اندازه‌گیری شد و نتایج به شرح زیر تفسیر شد: مناطق بیش از ۲۰mm نشان‌دهنده فعالیت بازدارندگی قوی، مناطق mm ۱۰ تا mm ۲۰ پتانسیل بازدارندگی متوسط و مناطق کمتر از mm ۱۰ نشان‌دهنده فعالیت بازدارندگی کم بودند.

شناسایی مولکولی پروبیوتیک‌ها

جدایه های انتخاب شده که از آزمون‌های قبلی بهترین نتایج را گرفتند برای شناسایی مولکولی ژن 16S rRNA مورد ارزیابی *قرار* گرفتند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ : توالی پرایمرهای مورد استفاده ژن 16S rRNA برای شناسایی *لاکتوباسیلوس* ها (۱۳)

طول قطعه	توالی پرایمر	نوع پرایمر	منبع
bp ۱۵۰۰	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	F	(۱۳)
	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	R	

شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR شامل: دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ °C به مدت زمان ۵ min، ۳۵ سیکل شامل ۱ min دقیقه در دمای ۹۰ °C، ۱ min در دمای ۵۵ °C و به مدت ۱ min و ۳۴ s در دمای ۷۲ °C انجام شد. در نهایت مرحله پلیمریزاسیون نهایی به مدت ۱۵ min در دمای ۷۲°C انجام گرفت. در الکتروفورز باند به اندازه bp ۱۵۰۰ محصول PCR مشخص کننده *لاکتوباسیلوس* ها است. باندهای تخلیص شده جهت توالی‌یابی به شرکت زیست

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

فناوری پیشگام ارسال گردید. توالی‌های بدست آمده با استفاده از امکان blast در بانک اطلاعاتی NCBI بررسی شده وجنس و گونه باکتری مشخص گردید.

تحلیل آماری

تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد. برای بررسی اینکه آیا تغییرات بین جدایه‌هایLAB تأثیر قابل‌توجهی بر پارامترهای کمی داشته است، آنالیز واریانس یک‌طرفه انجام گردید. همچنین آزمون Tukey برای بررسی تفاوت‌های بین مقادیر میانگین در $p<0.05$ انجام شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 انجام شد و تفاوت‌ها با $p<0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

از سه نمونه محصول ماست سنتی شهرستان بناب، در کل ۱۱ نوع کلنی باکتری‌های لاکتیک جداسازی گردید. نتایج بررسی مورفولوژیک و تست‌های بیوشیمیایی نشان داد که ۷ کلنی به *لاکتوباسیلوس*ها و ۴ کلنی به *استرپتوکوک*ها تعلق دارند(جدول ۲).

جدول ۲: نام جدایه‌های بدست آمده از هر سه نوع ماست محلی و تعیین جنس میکروارگانیسم ها

نام نمونه	نامگذاری جدایه ها	تعیین جنس جدایه ها	
		لاکتوباسیلوس	*استرپتوکوک*
Y1	Y1A, Y1B, Y1C, Y1D	Y1A, Y1B, Y1D	Y1C
Y2	Y2A, Y2B, Y2C	Y2A, Y2B,	Y2C
Y3	Y3A, Y3B, Y3C, Y3D	Y3B, Y3C, Y3D	Y3A

نتایج آزمون مقاومت به اسید و شیره معده

براساس نتایج مقاومت به اسید از ۱۱ جدایه مورد بررسی تنها ۲ جدایه مقاومت به اسید بسیار بالایی داشتند. ۶ جدایه مقاومت متوسطی از خود نشان دادند و ۳ جدایه مقاومت پایینی نسبت به اسید داشتند. از جدایه‌های با مقاومت بالا هر دو مربوط به *لاکتوباسیلوس*ها بودند و از ۶ جدایه با مقاومت متوسط ۲ جدایه مربوط به *استرپتوکوک*ها و ۴ جدایه جزء *لاکتوباسیل*ها بودند. در نهایت، از جدایه‌های با مقاومت پایین، یک جدایه مربوط به *استرپتوکوک*ها و دو جدایه از *لاکتوباسیل*ها بودند. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳: بررسی تست مقاومت به اسید در جدایه‌های بدست آمده از سه محصول لبنی مورد بررسی، تلقیح اولیه شاهد CFU ۱×۱۰^{۹}

نام جدایه	کانت میکروارگانیسم ها بعد از تیمار با اسید(CFU/mL)			
	pH=۴		pH=۲.۵	
	۴ ساعت	۳ ساعت	۴ ساعت	۳ ساعت
Y1A	۹.۴×۱۰^{۶}	۷.۴×۱۰^{۷}	۳.۲×۱۰^{۵}	۴.۳×۱۰^{۶}
Y1B	۸.۴×۱۰^{۶}	۳.۵×۱۰^{۷}	۸.۳×۱۰^{۵}	۱.۵×۱۰^{۶}
Y1C	۱×۱۰^{۶}	۴.۲×۱۰^{۷}	۳.۴×۱۰^{۵}	۱.۶×۱۰^{۶}
Y1D	۷.۲×۱۰^{۸}	۸.۳×۱۰^{۸}	۶.۵×۱۰^{۷}	۵.۱×۱۰^{۸}
Y2A	۲.۸×۱۰^{۴}	۳.۲×۱۰^{۶}	۲×۱۰^{۴}	۱×۱۰^{۵}
Y2B	۱.۴×۱۰^{۷}	۵.۶×۱۰^{۷}	۳.۹×۱۰^{۵}	۱.۳×۱۰^{۶}
Y2C	۱.۷×۱۰^{۵}	۴.۹×۱۰^{۶}	۲.۷×۱۰^{۵}	۳.۳×۱۰^{۶}
Y3A	۸.۶×۱۰^{۴}	۲.۶×۱۰^{۵}	۱.۷×۱۰^{۴}	۵.۶×۱۰^{۵}
Y3B	۲.۸×۱۰^{۵}	۷.۴×۱۰^{۶}	۳.۹×۱۰^{۴}	۱.۵×۱۰^{۵}
Y3C	۶×۱۰^{۸}	۶.۳×۱۰^{۸}	۵.۲×۱۰^{۷}	۱.۱×۱۰^{۸}
Y3D	۱.۸×۱۰^{۳}	۴.۴×۱۰^{۴}	۳.۸×۱۰^{۴}	۱×۱۰^{۶}

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

با بررسی ۱۱ جدایه نسبت به شیره معده(پپسین و تریپسین) مشخص شد که از میان جدایه‌های مورد بررسی ۴ جدایه مقاومت نشان دادند که شامل جدایه های Y1D، Y2B،Y3A و Y3C بودند. در این میان فقط جدایه‌های Y1D و Y3C بعد از ۲۴ ساعت دارای شمارش میکروبی بیش از CFU/mL ۱۰^۶ بودند و بقیه مقادیر کمتری نشان دادند.

نتایج مقاومت به نمک های صفراوی

جدول ۴ نتایج به دست آمده مبنی بر مقاومت جدایه‌های مورد بررسی نسبت به نمک‌های صفراوی را نشان می‌دهد. بر طبق فرمول ذکر شده اعداد C_{inh} کمتر از ۰.۴ نشان دهنده مقاومت مناسب جدایه نسبت به املاح صفراوی است. از ۱۱ جدایه مورد بررسی Y1D، Y3C و Y3D مقاومت بالا و قابل قبولی نسبت به املاح صفراوی نشان دادند که هر سه از *لاکتوباسیلوس*ها هستند و جدایه‌های دیگر که مقاومت متوسطی نسبت به املاح صفراوی داشتند شامل: Y1B، Y1C وY3B بودند که تنها Y1C جزء *استرپتوکوک*ها و بقیه از جنس *لاکتوباسیل*ها هستند.

جدول ۴: نتایج ۱۱جدایه مورد بررسی جهت تست مقاومت به نمک صفراوی

نام جدایه	ضریب بازدارندگی(C_{inh}) جدایه ها بعد از ۸ ساعت گرماگذاری
Y1A	۰.۵۵
Y1B	۰.۵۲
Y1C	۰.۵۷
Y1D	۰.۳۵
Y2A	۰.۷۵
Y2B	۰.۵۹
Y2C	۰.۶۳
Y3A	۰.۶۲
Y3B	۰.۴۹
Y3C	۰.۲۷
Y3D	۰.۳۶

نتایج مربوط به هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی

نتایج مربوط به هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی در جدول ۵ نشان داده شده است. طبق نتایج ارائه شده همه جدایه‌ها دارای خاصیت هیدرولیز املاح صفراوی هستند. در این میان بیشترین هیدرولیز مربوط به املاح صفراوی مربوط به جدایه Y3C و کمترین هیدرولیز مربوط به جدایه Y3D بوده است. در ارتباط با کلسترول نیز بیشترین هیدرولیز کلسترول در جدایه Y3C اتفاق افتاد و کمترین فعالیت هیدرولیز کلسترول نیز در ارتباط با Y3A بوده است.

جدول ۵: نتایج مربوط به هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی

نام جدایه	هیدرولیز کلسترول (درصد)	هیدرولیز املاح صفراوی(U/mg)
Y1A	۲۱.۱ ± ۲.۰۵ ^{b*}	۰.۲۳ ± ۰.۰۳ ^{a}
Y1B	۱۲.۴ ± ۱.۲۵ ^{d}	۰.۴۴ ± ۰.۰۲ ^{a}
Y1C	۳۴.۲ ± ۱.۲۷ ^{ab}	۰.۱۹ ± ۰.۰۱ ^{a}
Y1D	۱۱.۵ ± ۰.۰۵ ^{d}	۰.۱۷ ± ۰.۰۳ ^{ab}
Y2A	۲۰.۶ ± ۰.۵۹ ^{cd}	۰.۶۴ ± ۰.۰۱ ^{b}
Y2B	۲۱.۴ ± ۱.۵۴ ^{c}	۰.۶۱ ± ۰.۰۶ ^{ab}
Y2C	۱۴.۷ ± ۲.۳۶ ^{e}	۰.۵۱ ± ۰.۰۱ ^{c}
Y3A	۸.۸ ± ۳.۱۸ ^{f}	۰.۲۶ ± ۰.۰۱ ^{a}
Y3B	۱۷.۶ ± ۰.۰۵ ^{e}	۰.۸ ± ۰.۰۵ ^{cd}
Y3C	۳۶.۲ ± ۱.۱۳ ^{a}	۱.۰۱ ± ۰.۰۱ ^{a}
Y3D	۱۱.۳ ± ۰.۰۶ ^{e}	۰.۱۳ ± ۰.۰۶ ^{e}

*مقادیر عبارتند از عدد اصلی± انحراف استاندارد با سه مرتبه تکرار؛ حروف کوچک انگلیسی نشان دهنده تفاوت معنادار در هر ستون است($P<0.05$).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

نتایج خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول های Caco-2

نتایج آزمون های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول های اپیتلیال روده(Caco-2) در جدول ۶ بررسی شده است. همانطور که در جدول ۶ مشاهده می‌شود خود تجمعی در جدایه‌ها پس از ساعت ۴، نهایتا به عدد ۴.۹۱ در جدایه Y3B می‌رسد و کمترین میزان خود تجمعی بعد از ساعت ۴ با عدد ۱.۴۶ درصد مربوط به جدایهY1B است. پس از h ۲۴ ساعت، بیشترین میزان خود تجمعی مربوط به Y1D (۷۱.۹ درصد) و کمترین میزان مربوط به Y2A(۴۸.۷ درصد) است.

میزان آبگریزی توسط این ۱۱ جدایه در مقادیر متفاوتی مشاهده گردید، به طوری که کمترین میزان آن ۱۵.۷ درصد مربوط به Y3A و بیشترین میزان آن ۳۸.۳ درصد مربوط به Y3C بود.

بیشترین میزان چسبندگی به سلول های اپیتلیال مربوط به Y1B به میزان CFU/mL $۱۰^{۱۰}$ × ۸.۳ وکمترین میزان آن مربوط به Y3B به میزان CFU/mL $۱۰^{۱۰}$× ۶.۴ بود. در این میان اکثر جدایه‌ها دارای چسبندگی مناسبی به سلول‌های اپیتلیال بودند و همگی دارای مقادیر بالای باکتری(بیش از CFU/mL $۱۰^{۱۰}$) بودند.

جدول ۶: نتایج آزمون های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول های اپیتلیال روده(Caco-2)

نام جدایه	نتایج آزمون خود تجمعی(اتواگریگاسیون)		نتایج آزمون آبگریزی(درصد)	اتصال به رده سلولی Caco-2(پس از h ۲) (مقادیر کانت در لوگ ۱۰ می‌باشد)
	۴ h (درصد)	۲۴ h (درصد)		
Y1A	۲.۰۳ ± ۰.۴۳ ^{e*}	۶۳.۶ ± ۰.۵۹^{c}	۲۱.۷ ± ۱.۶۳ ^{cd}	۷.۴ ± ۰.۰۴ ^{c}
Y1B	۱.۴۶ ± ۰.۵۵^{i}	۵۶.۴ ± ۱.۲۳^{f}	۱۹.۵ ± ۰.۵۵ ^{cd}	۸.۳ ± ۰.۰۱ ^{a}
Y1C	۳.۶۴ ± ۰.۶۱^{d}	۴۹.۵ ± ۲.۱۱^{g}	۲۸.۱ ± ۱.۵ ^{bc}	۷.۷ ± ۰.۰۲ ^{c}
Y1D	۴.۰۹ ± ۰.۰۳ ^{a}	۷۱.۹ ± ۱.۴۵^{a}	۳۵.۵ ± ۱.۰۹ ^{c}	۷.۴ ± ۰.۰۵ ^{c}
Y2A	۲.۴۵ ± ۰.۵۷ ^{e}	۴۸.۷ ± ۲.۳۹^{g}	۳۲.۵ ± ۱.۸۴ ^{b}	۶.۸ ± ۰.۰۱ ^{f}
Y2B	۴.۴۷ ± ۰.۲۹^{f}	۵۷.۳ ± ۰.۷۱^{f}	۲۹.۳ ± ۰.۸۳ ^{b}	۷.۹ ± ۰.۰۲ ^{b}
Y2C	۲.۴۱ ± ۰.۵۹^{i}	۶۰.۶ ± ۱.۳۹^{c}	۲۲.۴ ± ۱.۶۶ ^{cd}	۷.۶ ± ۰.۰۲ ^{c}
Y3A	۳.۰۸ ± ۰.۱۶^{f}	۵۳.۲ ± ۲.۰۹^{c}	۱۵.۷ ± ۰.۴۹ ^{e}	۷.۸ ± ۰.۰۴ ^{b}
Y3B	۴.۹۱ ± ۰.۱۳^{f}	۶۱.۱ ± ۰.۶۹^{f}	۲۱.۸ ± ۱.۶۳ ^{d}	۶.۴ ± ۰.۰۱ ^{i}
Y3C	۲.۳۳ ± ۰.۷۶^{i}	۵۵.۴ ± ۱.۲۳^{g}	۳۸.۳ ± ۲.۴۸ ^{a}	۷.۹ ± ۰.۰۲ ^{b}
Y3D	۲.۵۷ ± ۰.۰۹^{i}	۶۴.۴ ± ۱.۳۸^{f}	۲۷.۱ ± ۱.۱۷ ^{cd}	۶.۵ ± ۰.۰۱ ^{g}

*مقادیر عبارتند از عدد اصلی± انحراف استاندارد با سه مرتبه تکرار؛ حروف کوچک انگلیسی نشان دهنده تفاوت معنادار در هر ستون است($P<0.05$).

نتیجه تست تجمیع مشترک(Co-aggregation) جدایه‌ها

جدایه‌ها نسبت به سه پاتوژن *اشریشیا کلی* ATCC 13706 ، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC1826 و *لیستریا مونوسیتوژنز* PTCC 1299) مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۷ مشخص شده است. نتایج نشان داد که Y3C دارای اثر قوی و بالای تجمیع مشترک نسبت به هر سه پاتوژن مورد بررسی است و از طرف دیگر جدایه‌های Y3Bو Y1B دارای کمترین اثر تجمیع مشترک با پاتوژن ها هستند.

جدول ۷: نتایج آزمون های تجمیع مشترک با سه پاتوژن *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسایتوژنز*

نام جدایه	درصد Co-aggregation		
	اشریشیا کلی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*لیستریا مونوسایتوژنز*
Y1A	۷.۱ ± ۰.۳۵ ^{d}	۱۲.۳ ± ۰.۶۳ ^{b}	۶.۲ ± ۰.۳۲ ^{f*}

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

Y1B	۵.۴ ± ۰.۳۲ f	۷.۹ ± ۰.۴۲ d	۶.۸ ± ۰.۴۵ e
Y1C	۱۰.۵ ± ۰.۷۴ c	۱۴.۹ ± ۰.۷۱ b	۹.۱ ± ۰.۶۵ d
Y1D	۶.۴ ± ۰.۳۵ e	۵.۶ ± ۰.۱۹ f	۵.۵ ± ۰.۴۳ g
Y2A	۱۸.۸ ± ۰.۴۵ b	۱۱.۷ ± ۰.۵۵ c	۱۰.۶ ± ۰.۶۱ c
Y2B	۷.۶ ± ۰.۵۳ d	۶.۱ ± ۰.۴۱ e	۶.۶ ± ۰.۳۹ e
Y2C	۹.۳ ± ۰.۸۱ c	۱۰.۷ ± ۰.۷۵ c	۸.۵ ± ۰.۵۹ d
Y3A	۱۶.۹ ± ۰.۷۲ b	۱۴.۶ ± ۰.۷۲ b	۱۲.۱ ± ۰.۷۳ b
Y3B	۶.۱ ± ۰.۱۶ e	۴.۳ ± ۰.۳۴ g	۵.۷ ± ۰.۲۷ g
Y3C	۲۷.۵ ± ۰.۹۵ a	۲۵.۶ ± ۱.۰۵ a	۳۱.۸ ± ۱.۱۷ a
Y3D	۱۰.۴ ± ۰.۲۳ c	۱۱.۵ ± ۰.۶۲ bc	۹.۷ ± ۰.۶۲ c

*مقادیر عبارتند از عدد اصلی± انحراف استاندارد با سه مرتبه تکرار؛ حروف کوچک انگلیسی نشان دهنده تفاوت معنادار در هر ستون است(P<0.05).

نتایج خاصیت ضد میکروبی جدایه‌ها

در جدول شماره ۸ خواص ضد میکروبی ۱۱ جدایه مورد بررسی نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده اکثر جدایه‌های به دست آمده دارای حد بازدارندگی متوسط و قوی هستند و تعداد کمی از آنها قدرت بازدارندگی اندکی را نشان دادند. در این میان جدایه Y3C بیشترین بازدارندگی در مقابل پاتوژن‌ها را نشان داد؛ به طوری که نسبت به *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* قدرت بازدارندگی متوسط و نسبت به بقیه پاتوژن‌های مورد آزمون قدرت بازدارندگی قوی داشت.

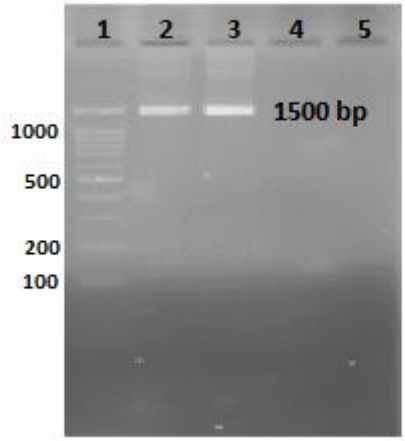
جدول ۸: نتایج آزمون های بررسی خواص ضد میکروبی جدایه‌های اسید لاکتیک

نام جدایه	قطر منطقه چاهک گذاری شده جهت بررسی خواص ضد میکروبی جدایه های اسید لاکتیک (mm)					
	اشریشیا کلی	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*لیستریا منوسایتوژنز*	*انتروکوکوس فکالیس*	*سودوموناس ائروژینوزا*	*سالمونلا پارا تیفی*
Y1A	۱۶ ± ۵ b*	۲۴ ± ۶ a	۲۲ ± ۲ a	۱۹ ± ۲ a	۱۲ ± ۲ d	۲۶ ± ۴ a
Y1B	۱۷ ± ۲ b	۱۸ ± ۲ b	۱۶ ± ۴ d	۱۶ ± ۴ b	۱۳ ± ۲ d	۱۷ ± ۲ c
Y1C	۲۴ ± ۶ a	۲۰ ± ۵ b	۱۸ ± ۲ c	۸ ± ۱ d	۱۵ ± ۳ c	۱۵ ± ۵ cd
Y1D	۲۶ ± ۲ a	۲۱ ± ۵ c	۲۶ ± ۶ a	۱۳ ± ۲ c	۱۴ ± ۲ c	۱۱ ± ۳ e
Y2A	۱۰ ± ۵ c	۲۴ ± ۲ a	۱۹ ± ۳ b	۱۷ ± ۴ b	۱۶ ± ۶ b	۱۷ ± ۵ c
Y2B	۰	۲۵ ± ۳ a	۲۵ ± ۷ a	۱۶ ± ۶ b	۱۶ ± ۴ b	۱۳ ± ۲ e
Y2C	۲۱ ± ۴ a	۱۶ ± ۲ c	۱۵ ± ۳ d	۱۷ ± ۳ b	۱۳ ± ۴ d	۲۱ ± ۶ b
Y3A	۱۴ ± ۳ c	۱۸ ± ۴ b	۲۳ ± ۷ ab	۹ ± ۲ d	۱۹ ± ۲ a	۱۹ ± ۲ bc
Y3B	۱۱ ± ۱ c	۱۷ ± ۲ c	۲۰ ± ۴ b	۱۵ ± ۲ c	۱۱ ± ۴ e	۱۷ ± ۵ c
Y3C	۲۸ ± ۵ a	۲۶ ± ۶ a	۲۷ ± ۳ a	۱۹ ± ۴ a	۱۹ ± ۲ a	۲۹ ± ۵ a
Y3D	۲۴ ± ۲ c	۲۲ ± ۴ a	۱۹ ± ۳ b	۱۳ ± ۵ c	۱۰ ± ۵ e	۲۰ ± ۷ b

*مقادیر عبارتند از عدد اصلی± انحراف استاندارد با سه مرتبه تکرار؛ حروف کوچک انگلیسی نشان دهنده تفاوت معنادار در هر ستون است(P<0.05).

در میان ۱۱ جدایه مورد بررسی ۲ جدایه نتایج بهتری در اکثر تست‌های ارزیابی پروبیوتیک ها داشتند. این جدایه ها با استفاده از PCR ژن 16S rRNAمورد ارزیابی قرار گرفته و تایید شدند(شکل۱). پس از توالی یابی و blast شدن توالی ها در سایت NCBI مشخص شد که جدایه Y1D، مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* با تشابه ۹۹ درصد و جدایه Y3C مربوط به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با تشابه۹۹ درصد هستند.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل ۱: PCR با پرایمرعمومی(یونیورسال) *لاکتوباسیل* ها و بدست آوردن باند نهایی ۱۵۰۰ جفت باز: ۱: Ladder ۱۰۰ جفت بازی، ۲: باند مربوط به جدایه Y1D ۳: باند مربوط به جدایه Y3C ، ۴ و۵: کنترل منفی.

بحث و نتیجه گیری

امروزه اثرات سودمند پروبیوتیک ها بر همگان آشکار شده است(۲-۴). به علت تولید باکتریوسین‌ها و کاهش pH ناشی از تولید اسیدهای آلی، از این میکروارگانیسم‌ها می‌توان برای ماندگاری مواد غذایی نیز بهره برد(۱۳). از طرف دیگر، ارتباط محصولات لبنی سنتی با سلامت انسان مدتهاست که اثبات شده است و این محصولات به عنوان منبع جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از قبیل *لاکتوباسیل*ها و *استرپتوکوک*ها محسوب می‌شوند. پژوهشگران در مطالعات مختلف سعی کرده‌اند سویه‌های اسید لاکتیک با قابلیت پروبیوتیک را از این محصولات جدا کنند. با اضافه کردن این سویه‌ها به مواد غذایی علاوه بر تضمین سلامت انسان می‌توان پذیرش عمومی این مواد غذایی را نیز بالا برد(۱۴).

در این مطالعه، هدف اصلی جداسازی باکتری‌های لاکتیک از ماست‌های سنتی شهرستان بناب از استان آذربایجان و همچنین بررسی خواص پروبیوتیکی مانند: مقاومت به اسید و محیط شبیه سازی شده معده، مقاومت به نمک‌های صفراوی، هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی، خاصیت ضد میکروبی و بررسی های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خود تجمعی و تجمیع مشترک است.

یکی از ملاک‌های بررسی پروبیوتیک‌ها مقاومت به اسید است(۱۵)؛ چرا که میکروارگانیسم‌هایی که دارای خواص پروبیوتیکی هستند باید بتوانند در اسید و شیره معده زنده بمانند تا در مسیر استقرار در روده موفق باشند(۱۶). در مطالعه حاضر از ۱۱ جدایه مورد بررسی؛ ۲ جدایه مقاومت به اسید بسیار بالایی داشتند. این نسبت باکتری‌های مقاوم به اسید با نتایج مطالعه مشابهی که بر روی محصولات لبنی استان فارس انجام شده است، مطابقت داشت(۱۷) و البته با مطالعه دیگری که بر روی ماست سنتی شهر خوی انجام شده بود؛ تقریباً مشابهت داشت(۱۸). هر چند در مطالعه حاضر، پس از تیمار سه و چهار ساعته در دو pH مختلف بین۳ تا ۴ لوگ از مقدار تلقیح اولیه کاسته شد. این نتایج با مطالعات دیگری مثل Tarique و همکاران (۲۰۲۲)، Ayyash و همکاران(۲۰۱۸)وYasmin و همکاران(۲۰۲۰)که بر روی محصولات سنتی کشورهای عربی مطالعه کردند، کمی متفاوت است؛ ولی در روند کلی مطابقت دارد(۷, ۱۵, ۱۹). در این مطالعات افت زنده ماندن باکتری کمتر بوده است و گاهی حتی یک لوگ گزارش شده است؛ ولی بیشتر جدایه‌ها مقاومت بالایی به اسید داشتند؛ که تقریباً با نتایج این بررسی منطبق است.

ویژگی دیگری که پروبیوتیک بودن یک باکتری را نشان می دهد مقاومت به شیره گوارشی شبیه سازی شده دارای آنزیم‌های تریپسین و پپسین است. در مطالعه حاضر از ۱۱ جدایه، ۴ جدایه به شیره معده(پپسین و تریپسین) مقاومت نشان دادند. در این میان فقط دو جدایه بعد از ۲۴ ساعت تیمار با شیره معده، دارای کانت بیش از $۱۰^{۶}$CFU/mL بودند و بقیه کانت کمتری نشان دادند. در بسیاری از مطالعات انجام شده بر خلاف مطالعه حاضر، دو ویژگی مقاومت به اسید و مقاومت به شیره معده ادغام شده‌اند وغالباً به صورت یک مطالعه جداگانه بررسی نشده‌اند. با این حال در مطالعات متعددی مثل Tarique و همکاران (۲۰۲۲)، Ayyash و همکاران(۲۰۱۸)وYasmin و همکاران(۲۰۲۰)؛ جدایه‌های

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مورد بررسی اغلب کمتر از یک لوگ افت را نشان دادند که مطالعه حاضر را تأیید نمی‌کنند(۷, ۱۵, ۱۹). احتمالاً تفاوت در روش‌ها دلیل اصلی این مغایرت می‌باشد.

خصوصیت دیگر در ارزیابی پروبیوتیک‌ها، مقاومت به املاح صفراوی و حل شدن باکتری در مواجهه با کلسترول است. در این مطالعه اکثر جدایه‌ها مقاومت بالایی به املاح صفراوی و کلسترول نشان دادند. نتایج این بررسی با مطالعات دیگر داخل ایران مانند زمانی و همکاران(۲۰۱۵) و نریمانی وهمکاران(۲۰۱۵) مطابقت دارد(۱۷, ۱۸). همچنین با مطالعات دیگری مثل Ayyash و همکاران (۲۰۱۸) و Tarique و همکاران، (۲۰۲۲)؛ Yerlikaya و Akbulut (۲۰۲۰)؛ مشابه است. هرچند تعداد اندکی از نتایج بسته به نوع جدایه بدست آمده؛ متفاوت هستند(۷, ۱۵, ۲۰).

برای ارزیابی خصوصیات دیگر باکتری‌های پروبیوتیک؛ نتایج آزمون‌های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده(Caco-2) مورد بررسی قرار گرفت. خودتجمعی ضامن ایجاد بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی است. در این مطالعه فاکتور خودتجمعی پس از ساعت ۴، در بالاترین میزان به عدد ۴.۹۱ درصد و درکمترین میزان به عدد ۱.۴۶ درصد رسید. پس از ۲۴ ساعت، بیشترین میزان خود تجمعی (۷۱.۹ درصد) و کمترین میزان (۴۸.۷ درصد) گزارش شد. این نتایج با بسیاری از مطالعات از جمله Tarique و همکاران(۲۰۲۲) و Alkalbani وهمکاران(۲۰۱۹) مشابه است، هرچند نسبت به مطالعاتی مثل وسیعی و همکاران (۲۰۲۰) بالاتر به نظر می‌رسد(۱۵, ۲۱, ۲۲).

میزان آبگریزی نیز ضامن اتصال جدایه مورد بررسی با سلول‌های اپیتلیال است. در این تحقیق، در ۱۱ جدایه مورد بررسی؛ آبگریزی در مقادیر متفاوتی مشاهده گردید، که بسته به نوع جدایه مورد بررسی بین ۱۵.۷درصد و ۳۸.۳درصدگزارش شد. این گستره وسیع نتایج نیز با اکثر مطالعات دیگری که در این رابطه انجام شده منطبق است(۱۵). نتایج به دست آمده در مقایسه با مطالعات دیگری که بر روی محصولات تخمیری غیر لبنی انجام شده است اعداد بالاتری را نشان داده است که احتمالاً به تنوع محصولات و تفاوت در انواع میکروارگانیسم‌ها بستگی دارد(۱۰, ۲۲).

بیشترین میزان چسبندگی به سلول های اپیتلیال به میزان CFU/mL $۱۰^{۱۰}\times$ ۸.۳ و کمترین آن به میزان CFU/mL $۱۰^{۱۰}\times$ ۶.۴ گزارش شد. در کل، اکثر جدایه‌ها دارای چسبندگی مناسبی به سلول‌های اپیتلیال بودند و همگی دارای مقادیر بالای باکتری (بیش از CFU/mL $۱۰^{۱۰}$) بودند. این خصوصیت در جهت پروبیوتیک بودن جدایه‌ها اهمیت بسزایی دارد و احتمال پروبیوتیک بودن آن‌ها را تأیید می‌کند. توانایی اتصال یک باکتری پروبیوتیک به سلول‌های اپیتلیال یک ویژگی وابسته به گونه است و نرخ‌های مختلف چسبندگی مشاهده شده در مطالعه حاضر نیز، احتمالاً به گونه میکروارگانیسم بستگی دارد. این تفاوت مشاهده شده در مطالعه Tarique و همکاران (۲۰۲۲)، وسیعی و همکاران(۲۰۲۰) وGao و همکاران(۲۰۲۰) نیز دیده می‌شود و وابستگی این خصوصیت به گونه مورد بررسی را تأیید می‌کند(۱۰, ۱۵, ۲۲).

ویژگی دیگر ارزیابی پروبیوتیک ها، تجمیع مشترک یا co-aggregation است که نشان دهنده اتصال هر جدایه به پاتوژن‌ها و ممانعت از اتصال پاتوژن‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده است. در این جدایه‌ها اثر تجمیع مشترک یا co-aggregation دارای درصدهای متفاوت هستند که در مطالعات دیگر نیز دیده می شود(۱۵). این مقادیر در کل، در محصولات لبنی در مقایسه با محصولات تخمیری دیگر همچون سرکه درصد بالاتری را نشان می‌دهند(۲۳, ۲۴).

در نهایت خصوصیت بازدارندگی جدایه‌های مورد بررسی نسبت به چند پاتوژن اصلی روده‌ای مورد بررسی قرار گرفت که می‌تواند یکی از ویژگی‌های اصلی سویه‌های پروبیوتیک باشد. طبق این مطالعه، اکثر جدایه‌های به دست آمده دارای حد بازدارندگی متوسط و قوی هستند. در این میان یکی از جدایه‌های مربوط به جنس *لاکتوباسیلوس* بیشترین

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

بازدارندگی در مقابل پاتوژن‌ها را نشان داد به طوری که نسبت به *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* قدرت بازدارندگی متوسط و نسبت به بقیه پاتوژن های مورد آزمون قدرت بازدارندگی قوی داشت. نتایج این آزمون در هر مطالعه بسته به جدایه‌های مورد بررسی مقادیر متفاوتی را نشان می‌دهد. این تفاوت‌ها در مطالعات زمانی و همکاران(۲۰۱۵)، Tarique و همکاران(۲۰۲۲)، Abushelaibi و همکاران(۲۰۱۷) و Sui و همکاران(۲۰۲۱) نیز دیده می‌شوند(۱۵, ۱۷, ۲۳, ۲۴). هرچند نتایج به دست آمده در این بررسی در مقایسه با بسیاری از مطالعات ذکر شده دارای مقاومت بالاتری بوده و با نتایج Tarique و همکاران(۲۰۲۲) نزدیکتر به نظر می رسد(۱۵).

در نهایت در میان ۱۱ جدایه مورد بررسی ۲ جدایه که در بیشتر ویژگی‌های مورد بررسی نتیجه بهتری از بقیه نشان دادند با استفاده از تست‌های مولکولی بررسی شدند. مطالعات تأییدی نشان داد که این دو جدایه مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* با تشابه ۹۹.۸ درصد و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با تشابه ۹۹ درصد هستند.

این مطالعه تأیید می‌کند که محصولات لبنی سنتی منابع مهمی برای جداسازی باکتریهای پروبیوتیک می‌باشند. بنا بر این، شناسایی و بهینه‌سازی جدایه‌های بومی که در اکثر بررسی‌ها، پتانسیل پروبیوتیکی بهتری دارند می‌تواند مسیر را برای تولید مکمل‌ها و محصولات پروبیوتیک، هموار کند.

تشکر و قدردانی

نویسنده این مقاله از پرسنل زحمت‌کش آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در این تحقیق نویسنده را یاری نمودند، قدردانی می‌نماید.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

منابع

1. El Far MS, Zakaria AS, Kassem MA, Wedn A, Guimei M, Edward EA. Promising biotherapeutic prospects of different probiotics and their derived postbiotic metabolites: in-vitro and histopathological investigation. BMC microbiology. 2023;23(1):1-14.
2. Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of functional foods. 2014;9:225-41.
3. Cerdó T, García-Santos JA, G. Bermúdez M, Campoy C. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. Nutrients. 2019;11(3):635.
4. Eslami M, Bahar A, Keikha M, Karbalaei M, Kobyliak N, Yousefi B. Probiotics function and modulation of the immune system in allergic diseases. Allergologia et Immunopathologia. 2020;48(6):771-88.
5. Latif A, Shehzad A, Niazi S, Zahid A, Ashraf W, Iqbal MW, et al. Probiotics: Mechanism of action, health benefits and their application in food industries. Frontiers in microbiology. 2023;14:1216674
6. Evivie SE, Huo G-C, Igene JO, Bian X. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. Food & nutrition research. 2017;61(1):1318034.
7. Ayyash M, Abushelaibi A, Al-Mahadin S, Enan M, El-Tarabily K, Shah N. In-vitro investigation into probiotic characterisation of Streptococcus and Enterococcus isolated from camel milk. LWT. 2018;87:478-87.
8. Narimani T, Tarinejad A. Isolation, biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoi city. 2014.
9. Harrigan W, McCance M. Laboratory methods in food and dairy. Microbiology Academic press London, UK pp. 1976:19-20.
10. Gao F, Sui L, Mu G, Qian F, Zhu X. Screening of potential probiotics with anti-Helicobacter pylori activity from infant feces through principal component analysis. Food Bioscience. 2021;42:101045.
11. Alameri F, Tarique M, Osaili T, Obaid R, Abdalla A, Masad R, et al. Lactic acid bacteria isolated from fresh vegetable products: Potential probiotic and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects. Microorganisms. 2022;10(2):389.
12. Cheraghi Saray S, Hosseinkhani A, Taghizadeh A, Mohammadzadeh H. Evaluation of Co-aggregation and Anti-Adhesive Effects of Selenium Nanoparticles and Selected Probiotic Strains on Clinical and Standard Strains of Index Pathogens. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2019;17(6):583-95.
13. Tarique M, Abdalla A, Masad R, Al-Sbiei A, Kizhakkayil J, Osaili T, et al. Potential probiotics and postbiotic characteristics including immunomodulatory effects of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt-like products. LWT. 2022;159:113207
14. Aroutcheva AA, Simoes JA, Faro S. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits Gardnerella vaginalis. Infectious diseases in obstetrics and gynecology. 2001;9:33-9.
15. Colombo M, Todorov SD, Eller M, Nero LA. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. Journal of Dairy Research. 2018;85(4):487-96.
16. Rokhtabnak N, Khaleghi M, Sasan HA. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2016;10(1):24-34.
17. Zamani N, Akhavan Sepahi A, Fazeli MR, Shariatmadari F. Isolation and Biochemical and Molecular Identification of Lactobacilli from Traditional Dairy in Fars Province and Investigation of Their Probiotic Potential. Journal of food science and technology (Iran). 2022;19(123):41-53.
18. Narimani T, Tarinejad A, Hejazi MA. Isolation and biochemical and molecular identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional cow milk and yogurt of Khoi city. Journal of Food Science & Technology (2008-8787). 2015;12(48).
19. Yasmin I, Saeed M, Khan WA, Khaliq A, Chughtai MFJ, Iqbal R, et al. In vitro

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of Bifidobacterium strains isolated from raw camel milk. Microorganisms. 2020;8(3):354.
20. Yerlikaya O, Akbulut N. In vitro characterisation of probiotic properties of Enterococcus faecium and Enterococcus durans strains isolated from raw milk and traditional dairy products. International Journal of Dairy Technology. 2020;73(1):98-107.
21. AlKalbani NS, Turner MS, Ayyash MM. Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and in vitro investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented sausage. Microbial Cell Factories. 2019;18(1):1-12.
22. Vasiee A, Falah F, Behbahani BA, Tabatabaee-Yazdi F. Probiotic characterization of Pediococcus strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2020;130(5):471-9.
23. Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah NP, Ayyash M. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT-Food Science and Technology. 2017;79:316-25.
24. Sui Y, Liu J, Liu Y, Wang Y, Xiao Y, Gao B, et al. In vitro probiotic characterization of Lactobacillus strains from fermented tangerine vinegar and their cholesterol degradation activity. Food Bioscience. 2021;39:100843.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

Isolation, identification and investigation of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from local yogurts of Bonab city

Morteza Mohajeri Amiri[1*]

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract:

The importance of probiotics in balancing the microbiota, regulating the function of the immune system, preventing the occurrence and recurrence of infectious diseases, improving digestive disorders and many other benefits has been proven. Investigations in traditional and local fermented products have led to the isolation of lactic acid bacteria in the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Streptococcus*, which are usually considered as probiotics. In this study, three local cow yogurts from Bonab city were used to isolate probiotics. Probiotic properties including tolerance to simulated digestive system conditions such as acid resistance, bile salt resistance, hydrolysis of cholesterol and bile salts, antimicrobial properties and physiological tests such as hydrophobicity, auto-aggregation and co-aggregation were investigated and finally selected isolates were evaluated for molecular identification. Of these three traditional products, 11 isolates were investigated, of which 7 isolates belonged to *Lactobacilli* and 4 isolates belonged to *Streptococci*. Most of the isolates were probiotic candidates in two or three characteristics, but among them, 2 isolates had better results in most of the probiotics evaluation tests using PCR for the16S rRNA gene analysis. The tests confirmed that both isolates were *Lactobacilli*. After sequencing and blasting the sequences on the NCBI site, it was found that one isolate is *Lactobacillus casei* and the other is *Lactobacillus rhamnosus* with more than 99% similarity. This study confirms that traditional dairy products are important sources for the isolation of probiotic bacteria. Therefore, the identification and optimization of local isolates, which in most studies have better probiotic potential, can pave the way for the production of probiotic supplements.

Key words: probiotic bacteria, traditional fermented products, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, 16S rRNA.

* biotechmm2016@gmail.com

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]