



شناسایی سویه‌های جدید *انتروکوکوس فاسیوم* با خواص پروبیوتیکی از منابع لبنی سنتی ایران

نسرین سیدقلعه^۱، کیوان بهشتی مال*^۲، رامش منجمی^۲، علی محمد احدی^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۲. گروه بیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳. گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۷

چکیده

یافتن سویه‌های جدید پروبیوتیکی می‌تواند در رسیدن به اهداف تغذیه‌ای و درمانی ناشی از مصرف آنها کمک کند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی پروبیوتیک‌ها از لبنیات سنتی شهرستان‌های اصفهان بوده است. باکتری‌های اسید لاکتیک از منابع لبنیاتی سنتی جداسازی شدند. خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها با انجام آزمون‌های تحمل نمک‌های صفراوی، تحمل اسید و نیز بررسی فعالیت همولیتیک آنها ارزیابی شد. سپس، قابلیت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم و همچنین فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های پروبیوتیک بر علیه جدایه‌های پاتوژن *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* سنجش شد. جهت شناسایی قطعی جدایه‌ها، کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی طراحی شده در ژن ۱۶S rRNA انجام شد و توالی‌های ژنی سویه‌ها در بانک جهانی ثبت شد. در مجموع ۳ سویه پروبیوتیک *انتروکوکوس فاسیوم* از محصولات لبنی جداسازی شدند که قادر به رشد در سطوح pH ۳ و ۴/۵ و دارای قدرت رشد در ۰/۳٪ نمک صفراوی بودند. هیچ یک از سویه‌ها قابلیت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم نداشتند. تمامی سویه‌ها، بدون اختلاف معنی دار، دارای فعالیت ضد میکروبی بر علیه *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر هاله‌های عدم رشد ۱۲ تا ۱۶ میلی‌متری بودند. سویه‌های جداسازی شده در پایگاه داده NCBI با شماره‌های دسترسی MZ853942، MZ854204 و MZ902025 ثبت شدند. با توجه به تأیید خواص پروبیوتیکی سویه‌های بومی جداسازی شده، استفاده از آنها در تولید مکمل‌های غذایی و محصولات لبنی پروبیوتیک توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، پروبیوتیک، لبنیات محلی، *انتروکوکوس فاسیوم*

* kbeheshtimaal@yahoo.com

اوتنوکوکوس^۳، ویسلا^۴، باسیلوس^۵، اوباکتریوم^۶، فکالی-باکتریوم^۷، اکرمانسیا^۸ و رززیوریا^۹ می باشند که برخی از آنها به تازگی گزارش شده اند (۵).

محتوی اسیدی معده و خواص ضد میکروبی آنزیم های گوارشی مانند پepsin از ورود و بقای باکتری های پروبیوتیک به روده جلوگیری می کند. در نتیجه، بقاء در چنین شرایط بحرانی یکی از مهم ترین چالش های فیزیولوژیکی است که کشت های پروبیوتیک باید در هنگام تجویز خوراکی تحمل کنند. برای مقابله با این چالش، پروبیوتیک ها را می توان با سایر محصولات غذایی ترکیب کرد تا این میکروارگانیسم هایی را قادر به زنده ماندن در طول فرآیند گوارش کند یا سویه های جدید پروبیوتیکی با بیشترین مقاومت در شرایط اسیدی را از منابع مختلف به دست آورد. اگرچه pH روده کوچک بین ۷ تا ۸ است و به طور قابل توجهی بقای پروبیوتیک ها را تهدید نمی کند، پانکراتین و نمک های صفراوی در روده کوچک می توانند رشد باکتری های پروبیوتیک را در روده مهار کنند (۶).

پروبیوتیک ها اثر مہاری بر رشد باکتری های بیماری زا دارند. این میکروارگانیسم ها اثر ضد میکروبی خود را از طریق تولید باکتریوسین، تولید اسید لاکتیک، کاهش نفوذپذیری روده، رقابت با باکتری های بیماری زا از طریق چسبندگی و تحریر ایمنی مخاطی اعمال می کنند (۷).

با توجه به نقش پروبیوتیک ها در پیشگیری و درمان انواعی از بیماری های گوارشی و اهمیت جداسازی آنها از منابع محلی، مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های پروبیوتیک از منابع لبنی محلی تهیه شده از شهرهای فریدن و گلپایگان انجام شد.

مقدمه

میکروفلور روده برای حفظ یکپارچگی سد روده و همچنین کمک به جذب مواد مغذی و تولید ویتامین ها و در نتیجه آن، حفظ عملکرد روده، وظایف مهمی برعهده دارد. عدم تعادل در میکروبیوتای طبیعی روده می تواند شرایط التهابی مزمن و تولید متابولیت های سرطانزا را افزایش دهد. زمانی که میکروبیوتای روده تغییر کند ممکن است باعث شروع و پیشرفت مسیرهای التهابی مزمن شده و منجر به تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی متفاوت و عمیقی شود که می تواند اختلالات گوارشی و سرطان را موجب شوند. پروبیوتیک ها می توانند با تنظیم میکروفلور روده در جلوگیری و درمان این مشکلات نقش مهمی را ایفا کنند (۱). حفظ تعادل میکروبیوتای روده امری ضروری است. نوع و تعداد میکروارگانیسم های موجود در میکروبیوتای روده به عواملی مانند سن، رژیم غذایی، آنزیم های پانکراس، شرایط مجرای روده، استرس، مصرف برخی داروها و سبک زندگی افراد بستگی دارد (۲، ۳).

باکتری های پروبیوتیک غالباً از غذاهای تخمیری سنتی یا از روده جدا شده اند. پروبیوتیک ها زمانی که در لبنیات و یا مکمل های دارویی استفاده می شوند، به عنوان مواد تشکیل دهنده زنده میکروبی نامیده می شوند (۴). این باکتری ها شامل گونه هایی از لاکتوباسیلوس^۲، بیفیدوباکتریوم^۲، لئوکونوستوک^۴، لاکتوکوکوس^۵، اتروکوکوس^۵، باکترئیدس^۷، کارنوباکتریوم^۸، پدیوکوکوس^۹، استرپتوکوکوس^{۱۰}، تترائونوکوکوس^{۱۱}، واگوکوکوس^{۱۲}

¹¹ Tetrigenococcus

¹² Vagococcus

¹³ Oenococcus

¹⁴ Weisella

¹⁵ Bacillus

¹⁶ Eubacterium

¹⁷ Faecalibacterium

¹⁸ Akkermansia

¹⁹ Roseburia

² Lactobacillus

³ Bifidobacterium

⁴ Leuconostoc

⁵ Lactococcus

⁶ Enterococcus

⁷ Bacteroides

⁸ Carnobacterium

⁹ Pedicoccus

¹⁰ Streptococcus

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از منابع لبنیاتی سنتی و شناسایی به روش‌های ماکروسکوپی، میکروسکوپی و بیوشیمیایی

نمونه برداری از منابع لبنیاتی

نمونه برداری از ماست و پنیر محلی از محله‌های فریدن و گلپایگان انجام شد و نمونه‌ها در فالکون‌های استریل در مجاورت یخ جمع‌آوری و در همان شرایط به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان ارسال شد.

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

پس از تهیه تعلیق باکتریایی از نمونه ماست و پنیر (انتقال جداگانه ۱۰ گرم از نمونه ماست و پنیر در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل)، ۱۰ میلی لیتر از تعلیق‌های تهیه شده به صورت جداگانه به ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت MRS²⁰ براث انتقال یافت تا باکتری‌ها به حداکثر مقدار خود برسند و در شرایط کم‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از تهیه سری رقت از نمونه‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در محیط کشت MRS آگار کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط کم‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. جهت خالص سازی کلنی مورد نظر، کلنی‌های تک در محیط کشت MRS آگار جدید به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط کم‌هوازی انکوبه گردید (۸).

انجام آزمون‌های شناسایی

جهت شناسایی مورفولوژی جدایه‌ها ابتدا کلنی‌های ایزوله رنگ آمیزی گرم شد و در زیر میکروسکوپ نوری مشاهده گردید، تست کاتالاز با استفاده از آب اکسیژنه جهت تأیید کاتالاز منفی بودن ایزوله‌ها انجام شد (۹).

ارزیابی سویه‌ها در آزمون‌های تحمل نمک

صفراوی و تحمل اسید

برای تعیین توانایی بقا در شرایط اسیدی، سویه‌های جدا شده در محیط های MRS با pH معادل ۱/۵ تا ۳ آزمایش شدند.

در همه موارد جهت کاهش pH، از اسید کلریدیک ۸ نرمال استفاده شد و از محیط MRS با pH برابر با ۶/۴ به عنوان شاهد استفاده شد. برای تعیین توانایی بقا در شرایط نمک‌های صفراوی، این باکتری‌ها به محیط MRS حاوی ۰/۳ درصد نمک صفراوی اضافه شدند. محیط‌های کشت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. توانایی رشد جدایه‌های مورد مطالعه در محیط‌های فوق با مشاهده تغییرات کدورت (به صورت چشمی) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

بررسی فعالیت همولیتیک پروبیوتیک‌های جداسازی شده

به منظور ارزیابی ایمنی سویه‌های جداسازی شده، فعالیت همولیتیک آن‌ها پس از کشت خطی بر روی محیط کشت آگار خون دار حاوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند و گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت همولیتیک سویه‌ها بر اساس تشکیل هاله در اطراف کلنی‌ها مشخص گردید. در این آزمون از باکتری /ستافیلوکوکوس آئروس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۱، ۱۲).

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک‌های جداسازی شده

برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتری‌های پروبیوتیک جدا شده از ماست و پنیر سنتی از محیط مولر هیتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش انتشار از چاهک برای تعیین اثر مهارکنندگی باکتری‌های پروبیوتیک در مقابل جدایه‌های باکتری‌های /شریشیا کلای و /ستافیلوکوکوس /اورئوس استفاده شد. باکتری‌های پاتوژن در محیط کشت مولر هیتون آگار به روش چمنی کشت داده شد و با لوله پاستورچاهک در آن ایجاد کرده و سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک به طور جداگانه در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان میانگین هاله‌های عدم رشد جدایه‌ها در مقابل سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک اندازه‌گیری شد (۱۰).

²⁰ deMan, Rogosa and Sharpe

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم پروبیوتیک‌های جداسازی شده

برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتری‌های پروبیوتیک جدا شده از ماست و پنیر سنتی، ابتدا از کشت‌های تازه باکتری‌ها در محیط کشت MRS سوسپانسیون‌هایی با کدورت معادل کدورت نیم مک فارلند با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ در طول موج ۶۳۰ نانومتر تهیه گردید. پس از آن، ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده در ۳ تکرار به چاهک‌های میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل تلقیح گردید. چاهک حاوی MRS بدون باکتری به عنوان کنترل منفی و یک چاهک حاوی جدایه‌ای از سودوموناس *اثرورینوزا* با قابلیت تشکیل بیوفیلم در محیط کشت TSB^{۲۱}، به عنوان چاهک کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس در میکروپلیت گذاشته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از طی این مدت، محلول رویی موجود در هر چاهک دور ریخته شد و هر چاهک با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی سه بار شست و شو داده شد. بین هر مرحله میکروپلیت تکان داده شد تا سلول‌های پلانکتونیک جدا شوند. پس از آن میکروپلیت به صورت وارونه بر روی یک دستمال کاغذی قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن به هر یک از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در مکان ثابتی قرار گرفت تا بیوفیلم‌های تشکیل شده در مجاورت اتانول تثبیت شوند. پس از آن محتوی هر چاهک تخلیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. سپس، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲٪ اضافه شد و ۱۵ دقیقه در مکان ثابتی قرار گرفت. پس از آن میکروپلیت در مسیر آب شهری کاملاً شست و شو داده شد به طوری که آب خارج شده از هر چاهک کاملاً بیرنگ باشد. در این مرحله از نظر کیفی تشکیل بیوفیلم از لحاظ شدت رنگ قابل رؤیت بود. پس از آن میکروتیتر بر روی یک سطح جاذب قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. به منظور بررسی تولید کمی

بیوفیلم ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ به هر چاهک تلقیح گردید و در دستگاه خوانش ELISA جذب نوری آن در طول موج ۴۹۲ تا ۶۳۰ نانومتر قرائت گردید و نتایج با چاهک‌های کنترل منفی و کنترل مثبت مقایسه شد. در نهایت دسته بندی باکتری‌ها بر اساس جذب نوری (OD) بیوفیلم به صورت زیر محاسبه گردید (۱۳):

غیر چسبنده: $OD \leq OD_c$

چسبندگی ضعیف: $OD_c < OD \leq 2OD_c$

چسبندگی متوسط: $2OD_c < OD \leq 4OD_c$

چسبندگی قوی: $4OD_c < OD$ (۲۴).

(OD): میانگین جذب نوری یک باکتری و OD_c : میانگین

جذب نوری چاهک‌های شاهد)

شناسایی مولکولی با روش کلنی-PCR^{۲۲}

یکی از روش‌هایی که از طریق آن می‌توان از وجود قطعه‌ی ژنی خاصی در باکتری مطمئن شد، انجام کلنی-PCR می‌باشد. در این مطالعه مقداری از کلنی خالص سازی شده، با استفاده از لوپ استریل در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر لازم جهت انجام کلنی-PCR در جدول ۱ نشان داده شده است. مخلوط PCR مورد استفاده با حجم کلی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (۱X)، کلرید منیزیم (۱/۵ میلی‌مول بر لیتر)، dNTP (۲۰۰ میکرومول بر لیتر)، پرایمر پیشرو و معکوس (هر کدام ۰/۴ میکرومول بر لیتر) و آنزیم Taq پلی مراز (۱ واحد در مخلوط نهایی) بود. میزان یک نانوگرم DNA الگو به مخلوط PCR اضافه شد و سپس مخلوط واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) قرار داده شد تا طبق برنامه مورد نظر تکثیر انجام شود. در این مطالعه از پرایمرهای عمومی طراحی شده در ژن S ۱۶rRNA استفاده شد که توالی آن‌ها در جدول ۱ ارائه شده است. کلیه مراحل طراحی و ساخت این پرایمرها توسط شرکت تالی ژن پارس (ایران) انجام شد. برنامه دمایی و زمانی PCR در جدول ۲ مشاهده می‌شود. پس از اتمام PCR ویال

²² Colony-Polymerase chain reaction

²¹ Tryptic soy broth

ها از دستگاه خارج شد و برای مراحل بعدی در فریزر با دمای 20°C - درجه سانتیگراد نگه داری شد.

جدول ۲: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن ۱۶S rRNA (۱۴)

طول پرایمر	توالی	پرایمر
۲۰ نوکلئوتید	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	8F
۱۹ نوکلئوتید	GTA TTA CCG CGG CTG CTG G	518R

جدول ۲: سیکل حرارتی استفاده شده جهت انجام PCR قطعه مورد نظر در ژن ۱۶S rRNA

مرحله	واکنش	دما (سانتی گراد)	زمان (ثانیه)
۱	واسرشت اولیه	۹۴	۳۰۰
۲	واسرشت	۹۴	۳۰
۳	اتصال پرایمر	۵۵	۴۰
۴	تکثیر	۷۲	۴۵
۵	تکثیر نهایی	۷۲	۳۰۰

مراحل ۲ تا ۴ با ۳۰ تکرار انجام شد.

خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

ویژگی‌های جدایه‌های شناسایی شده از محصولات لبنی مورد مطالعه در جدول ۳ آمده است. نتایج توانایی رشد سویه‌ها در مقادیر مختلف pH و ۰/۳٪ نمک صفراوی و همچنین توانایی تشکیل بیوفیلم توسط آنها در جدول ۴ آمده است. همه جدایه‌ها قادر به رشد در مقادیر pH ۳ و ۴/۵ بودند. همه جدایه‌ها قدرت تحمل صفرا را داشتند. کلنی‌های جداسازی شده همگی کاتالاز منفی و همولیز منفی بودند و قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم نداشتند. نمایی از کلنی یکی از باکتری‌های پروبیوتیک، تست تحمل اسید و تست همولیز آن در شکل ۱ مشاهده می‌شود. در شکل ۲ نمایی از عدم تشکیل بیوفیلم توسط ۳ جدایه پروبیوتیک، در مقایسه با کنترل مثبت و کنترل منفی مشاهده می‌شود.

ارسال محصول حاصل از PCR جهت تعیین توالی

پس از بررسی کیفیت محصول PCR حاصل از تکثیر قطعه مورد نظر مربوط به ژن کدکننده ۱۶S rRNA از نظر تک باند بودن، ۲۵ میکرولیتر محصول PCR به همراه ۲۰ میکرولیتر پرایمرهای پیشرو و معکوس جهت تعیین توالی به شرکت تالی ژن پارس ارسال گردید.

بررسی شباهت توالی با توالی‌های بانک جهانی NCBI و ثبت ژن

نتایج توسط نرم افزار Chromas ۲/۱ بررسی و تصحیح شده و سپس در NCBI به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت بر اساس همولوژی بدست آمده گونه مورد نظر مورد شناسایی اولیه قرار گرفت.

نتایج

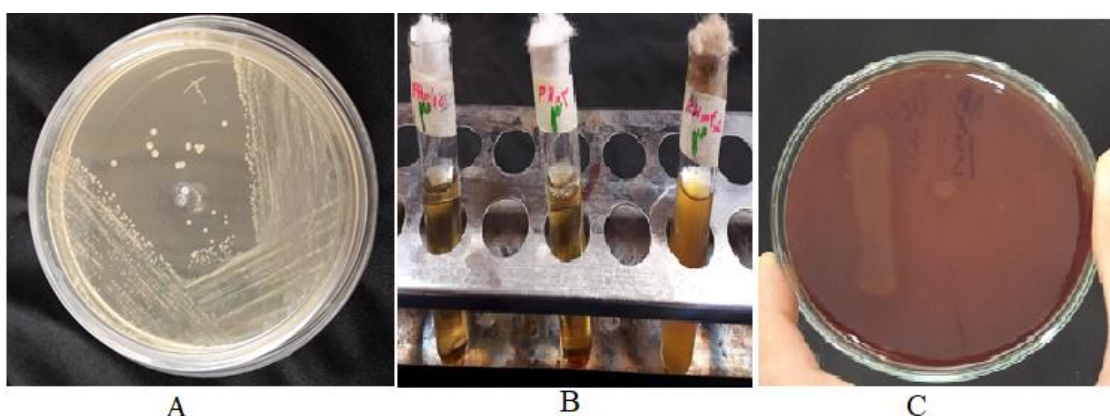
جدول ۳: ویژگی‌های جدایه‌های شناسایی شده از محصولات لبنی مورد مطالعه

منشا و محل نام جدایه	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی
پنیر گلپایگان	کلنی‌های ریز، گرد، موکوییدی، شیری رنگ	کوکسی، گرم مثبت، فاقد اسپور
ماست گلپایگان	کلنی‌های ریز، گرد، موکوییدی، شیری رنگ	کوکسی، گرم مثبت، فاقد اسپور
پنیر فریدن	کلنی‌های ریز، گرد، موکوییدی، شیری رنگ	کوکسی، گرم مثبت، فاقد اسپور

جدول ۴: نتایج توانایی رشد جدایه‌ها در مقادیر مختلف pH و ۰/۳٪ نمک صغراوی و توانایی چسبندگی و تشکیل بیوفیلم توسط آنها

جدایه‌ها	رشد در pH = ۱/۵	رشد در pH = ۳	رشد در pH = ۴/۵	رشد در ۰/۳٪ نمک صغراوی	توانایی چسبندگی و تشکیل بیوفیلم
۳	-	+	+	+	غیر چسبنده
۸	-	+	+	+	غیر چسبنده
۱۳	-	+	+	+	غیر چسبنده

+ رشد، - عدم رشد



شکل ۱: A. کلنی حاصل از خالص سازی باکتری پروبیوتیک. B. تست تحمل اسید توسط پروبیوتیک‌ها. C. بررسی فعالیت همولیتیک باکتری پروبیوتیک



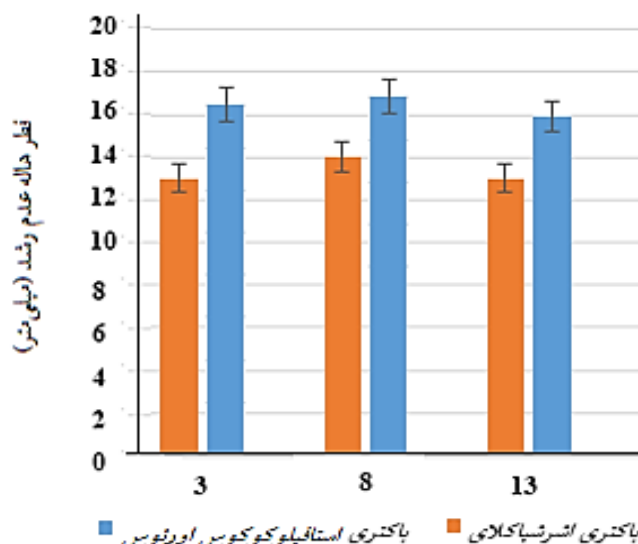
شکل ۲: نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های پروبیوتیک. چاهک‌های ۱ تا ۹ عدم تشکیل بیوفیلم توسط ۳ جدایه مورد بررسی در ۳ تکرار. چاهک‌های ۱۰ تا ۱۲ کنترل مثبت

آئروژینوزا و اشیریشیا کلای به کمک روش چاهک با ۳ بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت که اثر مثبتی در برداشت و تمام گونه‌ها توانستند باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند. قطر هاله‌های عدم رشد در آزمایش مهارکنندگی آنها از ۱۲ تا ۱۶ میلی متر متغیر بود که نشان می‌دهد همه جدایه‌ها بدون

فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها به روش انتشار از چاهک

پس از جداسازی و شناسایی سویه‌های پروبیوتیکی، فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت آنها که از طریق سانتریفیوژ جداسازی شده بود، بر علیه دو سویه بیماری‌زای سودوموناس

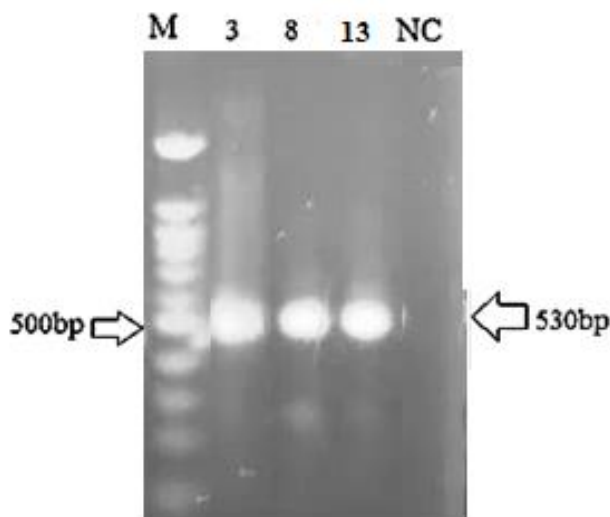
اختلاف معنی‌دار از یکدیگر اثر مهارى مناسبى بر روى باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه داشتند (شکل ۳).



شکل ۳: فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جداسازی شده بر علیه/اشرشیا کلائی و استافیلوکوکوس اورئوس

نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR در ۳ جدایه باکتریایی با از پرایمرهای یونیورسال F8 و R518 در شکل ۴ آورده شده است.

شناسایی مولکولی سویه‌ها



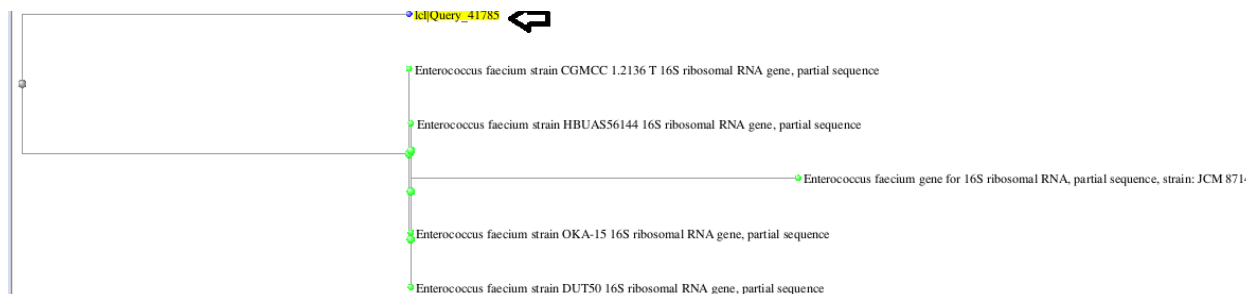
شکل ۴: بررسی محصولات PCR تکثیر بخشی از ژن rRNA ۱۶S در ژل آگارز ۱٪. چاهک اول مارکر اندازه DNA (M)، چاهک‌های دوم تا چهارم ژن تکثیر شده در جدایه‌های باکتریایی ۳، ۸ و ۱۳ با باند حدود ۵۳۰ جفت بازی، چاهک پنجم کنترل منفی (NC) است.

همولوژی و دندروگرام‌های هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه را بعد از مقایسه هردو توالی رفت و برگشت و اصلاحات لازم نشان می‌دهد.

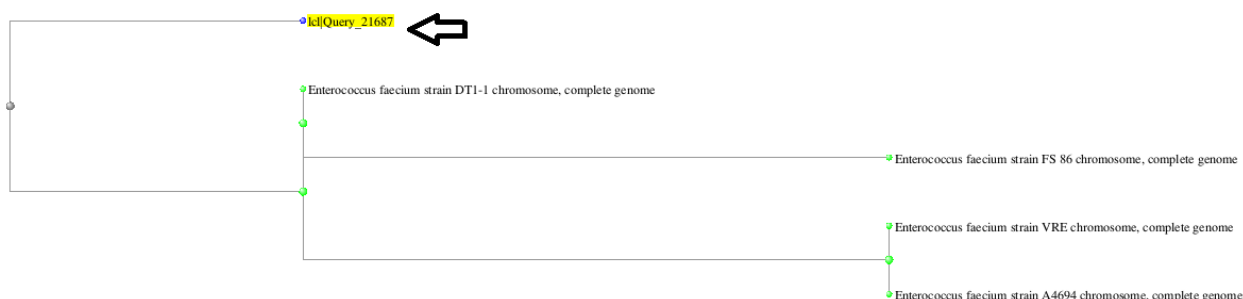
نتایج شناسایی گونه باکتری‌های جداسازی شده که در NCBI به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت، در جدول ۵ آمده است. شکل‌های ۵ تا ۷ نتیجه بررسی

جدول ۵. سویه‌های پروبیوتیک شناسایی شده در محصولات لبنی

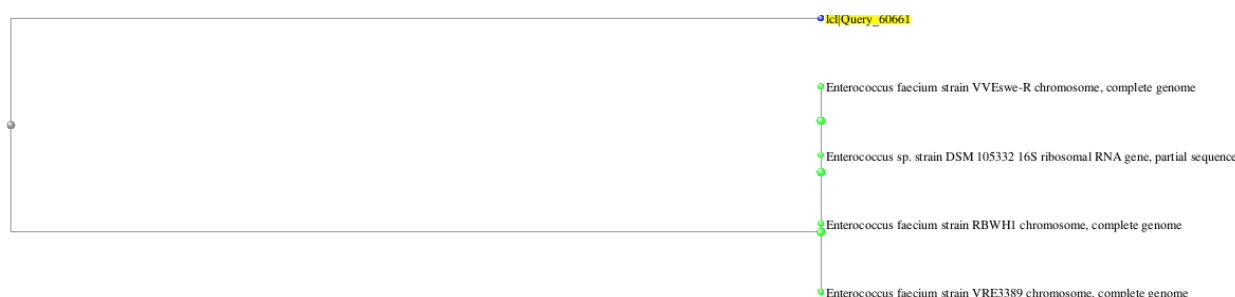
نام جدایه	منشا، جداسازی سویه	نام گونه	نام سویه ثبت شده در بانک جهانی ژن	شماره دسترسی بانک جهانی ژن
۳	پنیر گلپایگان	انتروکوکوس فاسیوم	SBAM-IAUF-1	MZ853942
۸	ماست گلپایگان	انتروکوکوس فاسیوم	SBAM-IAUF-2	MZ854204
۱۳	پنیر فریدن	انتروکوکوس فاسیوم	SBAM-IAUF-5	MZ902025



شکل ۵: درخت فیلوژنی به دست آمده از سایت NCBI در مورد نمونه باکتری ۳. این دندروگرام از نظر توالی این بخش از ژن ۱۶S rRNA نشاندهنده واریانت جدیدی می‌باشد.



شکل ۶: درخت فیلوژنی به دست آمده از سایت NCBI در مورد نمونه باکتری ۸. این دندروگرام از نظر توالی این بخش از ژن ۱۶S rRNA نشاندهنده واریانت جدیدی می‌باشد.



شکل ۷: درخت فیلوژنی بدست آمده از سایت NCBI در مورد نمونه باکتری ۱۳. این دندروگرام از نظر توالی این بخش از ژن ۱۶S rRNA نشاندهنده واریانت جدیدی می‌باشد.

بحث

محصولات غذایی، به خصوص محصولات لبنی در سطح

وسعی استفاده شود. پروبیوتیک‌ها اثر خود را بر عوامل پاتوژن از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی (۱۷)، خشی کردن ترکیبات مضر پاتوژن‌ها مانند انتروتوکسین‌ها، آمونیاک و آمینواسیدهای سمی، تقویت ایمنی (افزایش

مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا، به خصوص پاتوژن‌های گرم منفی، در کنار سایر خواص پروبیوتیک‌ها مانند کاهش پاسخ التهابی روده (۱۵) و کاهش کلسترول از طریق جذب آن (۱۶) موجب شده است از این میکروارگانیسم‌ها در

فعالیت لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها) به خصوص در روده (۱۸) اعمال می‌کنند. یافتن سویه‌های پروبیوتیک جدید با خواص آنتاگونیستی بالا در برابر پاتوژن‌ها در ارتقای سلامت جامعه اهمیت دارد. این میکروارگانیسم‌ها باید بتوانند در شرایط بدن انسان بقاء داشته باشند و مصرف کنندگان نیز باید بتوانند مواد غذایی حاوی تعداد زیادی از سلول‌های آنها را تحمل کنند. زنده ماندن پروبیوتیک‌ها را می‌توان با انتخاب مناسب سویه-های مقاوم به اسید و صفرا بهبود بخشید (۱۹). از این رو برای تشخیص پتانسیل پروبیوتیکی سویه‌های جداسازی شده در مطالعه حاضر، تحمل و مقاومت آنها نسبت به این شرایط مورد آزمایش قرار گرفت. روش‌های دیگری نیز برای افزایش بقای پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود که از جمله آنها می‌توان به استفاده از پوشاننده‌های غیر قابل نفوذ نسبت به اکسیژن، کپسوله کردن، ترکیب کردن با ریزمغذی‌ها مانند پپتیدها و اسیدهای آمینه و استفاده از آنها همراه با غذاهای نگهدارنده مانند ماست اشاره کرد (۸). در مطالعه حاضر سه سویه پروبیوتیک از ماست و پنیرهای محلی جداسازی، خالص سازی و تعیین خصوصیت شدند. تمام سویه‌ها توانستند رشد باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند. همه سویه‌ها قادر به رشد در pH اسیدی با مقادیر ۳ و ۴/۵ بودند. هیچکدام از سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفیلم از خود نشان ندادند. سه سویه *انتروکوکوس فاسیوم* واریانت‌های جدید پروبیوتیکی بودند. در مطالعه مشابهی چهار سویه *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شد که در pH = ۴ به طور کامل زنده ماندند و در pH = ۳ مقداری زنده ماندن را از دست دادند، اما هیچ کدام در pH = ۲ زنده نماندند (۲۰). مقاومت به اسید در سویه-های متعلق به گونه‌های دیگر پروبیوتیکی مانند *لاکتوکوکوس لاکتیس*^{۲۴} (۲۱)، *لاکتوباسیلوس پلانٹاروم*^{۲۵}، *لیموسیلوس لاکتوباسیلوس فرمنتوم*^{۲۶}، *لاکتی پلانٹی باسیلوس پلانٹاروم*^{۲۷} و گونه‌های *لاکتی/ستی باسیوس*^{۲۸} نیز مشاهده شده است (۲۲).

باکتری‌های پروبیوتیک در گروه باکتری‌های اسید لاکتیک قرار دارند. این باکتری‌ها با تولید اسید موجب کاهش pH محیط پیرامون خود می‌شوند. از این خاصیت می‌توان برای کنترل عوارض برخی بیماری‌های گوارشی مانند عفونت و سرطان استفاده کرد. افرادی که سرطان روده بزرگ دارند ممکن است در مقایسه با افراد سالم، pH داخل کولونی بیشتری داشته باشند. مقادیر بالاتر pH در کولون این افراد را می‌توان به مقادیر کم اسیدهای آلی و اسیدهای چرب زنجیر کوتاه موجود در مدفوع این افراد نسبت داد. این اسیدها را می‌توان از فعالیت متابولیکی پروبیوتیک‌ها تولید کرد. بنابراین از pH مدفوع به عنوان نشانگر غیر مستقیم حضور و فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک استفاده شده است. مقادیر پایین pH داخل کولونی همچنین، از فعالیت آنزیم‌های باکتریایی مسئول تولید ترکیبات سرطان‌زا جلوگیری می‌کند و می‌تواند در پیشگیری از سرطان‌های گوارشی نقش داشته باشد (۲۳). اثرات ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها برای کنترل پاتوژن‌های گوارشی در مطالعات مختلف نشان داده شده است. نتایج یک مطالعه نشان داده است که ترکیب باکتری‌های پروبیوتیک دسته *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس پلانٹاروم* به تعدیل ترکیب میکروبیوتای روده کمک می‌کند و این امر با افزایش فراوانی نسبی *لاکتوباسیلوس* در روده و کاهش برخی باکتری‌های بیماری‌زا بالقوه مشخص شده است. این ترکیب همچنین در کنترل تومور گلیومای روده در حیوانات آزمایشگاهی مؤثر بوده است (۲۴). همچنین، در مطالعه دیگری گزارش شده است که ۱۱ سویه از باکتری‌های پروبیوتیک چسبندگی/اشریشیا کلای را به سلول‌های کاکو-۲^{۲۹} مهار کرده‌اند (۲۵). در یک مطالعه *لاکتوباسیلوس پلانٹاروم* اثر مهار روی گونه‌های مختلف جنس *انتروکوکوس*، *لاکتوباسیلوس*، *سودوموناس*، *استریتوکوکوس*، *استافیلوکوکوس* و *لیستریا* کارایی نشان داد (۲۶). در مطالعه مشابه، *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* قادر به مهار *لیستریا منوسایتوزنز* و *اشریشیا کلای* بود (۲۷). سویه‌هایی از

²⁷ *Lactiplantibacillus plantarum*

²⁸ *Lactocaseibacillus*

²⁹ Caco-2

²⁴ *Lactococcus lactis*

²⁵ *Lactiplantibacillus plantarum*

²⁶ *Limosilactobacillus fermentum*

لبنی را از طریق کنترل پاتوژن‌ها بهبود بیشتری ببخشند (۳۰). برای درک کامل مکانیسم‌های عمل باکتری‌های جداسازی شده و تأیید ایمنی آنها، آزمایش‌های *in vivo* توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ۶ سویه پروبیوتیکی از لبنیات محلی استان اصفهان جداسازی شدند. همه سویه‌ها قادر به تحمل شرایط اسیدی و صفرا بودند و خاصیت ضد میکروبی علیه سویه‌های پاتوژن *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند. هیچ یک از سویه‌ها توانایی تشکیل بیوفilm نداشتند. سویه‌های پروبیوتیکی *اُتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شده، واریانت‌های جدید پروبیوتیکی بودند. این باکتری‌ها کاربرد بالقوه‌ای دارند که در کشت تک یا همزمان با سایر پروبیوتیک‌ها برای مهار پاتوژن‌های روده‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

اُتروکوکوس فاسیوم در مطالعات دیگر نیز از منابع لبنی جداسازی شده‌اند و به عنوان باکتری پروبیوتیک مطرح شده‌اند (۲۸، ۲۹). در مطالعه حاضر، سویه‌های جدید *اُتروکوکوس فاسیوم* دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* بودند و می‌توان در مطالعات بعدی از آنها به تنهایی یا به صورت کنسرسیوم ترکیبی با سایر پروبیوتیک‌های جداسازی شده در مطالعات ضد میکروبی و ضد سرطان استفاده کرد. همچنین با توجه به این که توانایی اسیدی کردن سویه‌های پروبیوتیک یکی از مهمترین ویژگی‌های آنها در محصولات لبنی است، از این سویه‌ها می‌توان در فن‌آوری تولید مکمل‌های غذایی و کشت‌های آغازگر حاوی پروبیوتیک استفاده کرد، زیرا با عبور از شرایط اسیدی معده و صفرا، می‌توانند با کاهش pH رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و/یا میکروارگانیسم‌هایی که مسئول فساد هستند را مهار کنند و خواص محصولات

1. Abatenh E, Gizaw B, Tsegay Z, Tefera G, Aynalem E. Health benefits of probiotics. *J Bacteriology and Infectious Disease*. 2018;2(1).
2. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya JB, Wei L, Li J, Chen ZS. Microbiota in health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*. 2022 Apr 23;7(1):1-28.
3. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The human microbiota in health and disease. *Engineering*. 2017;3(1):71-82.
4. Zommiti M, Feuilloy MG, Connil N. Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. *Microorganisms*. 2020;8(12):1907.
5. Al-Fakhrany OM, Elekhawy E. Next-generation probiotics: the upcoming biotherapeutics. *Molecular Biology Reports*. 2024;51(1):505.
6. Yamada T, Shimizu K, Ogura H, Asahara T, Nomoto K, Yamakawa K, Hamasaki T, Nakahori Y, Ohnishi M, Kuwagata Y, Shimazu T. Rapid and sustained long-term decrease of fecal short-chain fatty acids in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2015;39(5):569-77.
7. da Silva AR, de Souza de Azevedo PO, Converti A, de Souza Oliveira RP. Cultivation of lactic acid bacteria and evaluation of the antimicrobial potential of partially purified bacteriocin-like inhibitory substances against cariogenic and food pathogens. *Fermentation*. 2022;8(8):400.
8. Aleman RS, Yadav A. Systematic review of probiotics and their potential for developing functional nondairy foods. *Applied Microbiology*. 2023;4(1):47-69.
9. Bergey DH. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Lippincott Williams & Wilkins; 1994.
10. Chen Z, Leng X, Zhou F, Shen W, Zhang H, Yu Q, Meng X, Fan H, Qin M. Screening and identification of probiotic lactobacilli from the infant gut microbiota to alleviate lead toxicity. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2023;15(4):821-31.
11. Asadi A, Lohrasbi V, Abdi M, Mirkalantari S, Esghaei M, Kashanian M, Oshaghi M, Talebi M. The probiotic properties and potential of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from healthy women against some vaginal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. 2022;74(5):752-64.
12. Wei C, Luo K, Wang M, Li Y, Pan M, Xie Y, Qin G, Liu Y, Li L, Liu Q, Tian X. Evaluation of potential probiotic properties of a strain of *Lactobacillus plantarum* for shrimp farming: from beneficial functions to safety assessment. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:854131.
13. Jebali N, Rabbani Khorasgani M, Kianfar M, Emami H. Evaluation of the effects of honey, vinegar and rosewater on adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Journal of Isfahan Dental School*. 2016;12(3):232-247.
14. Ben-Dov E, Siboni N, Shapiro OH, Arotsker L, Kushmaro A. Substitution by inosine at the 3'-ultimate and penultimate positions of 16S rRNA gene universal primers. *Microbial Ecology*. 2011;61:1-6.
15. Wang W, Zhu LJ, Leng YQ, Wang YW, Shi T, Wang WZ, Sun JC. Inflammatory response: a crucial way for gut microbes to regulate cardiovascular diseases. *Nutrients*. 2023;15(3):607.
16. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences*. 2010;11:2499-2522.
17. Fijan S. Probiotics and their antimicrobial effect. *Microorganisms*. 2023;11(2):528.
18. Wang X, Zhang P, Zhang X. Probiotics regulate gut microbiota: an effective method to improve immunity. *Molecules*. 2021;26(19):6076.
19. 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.
20. Champagne CP, Gardner NJ. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*. 2008;41(5):539-43.
21. Barman S, Ghosh R, Mandal NC. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. *Annals of Agrarian Science*. 2018;16(3):286-96.
22. Ko HI, Jeong CH, Hong SW, Eun JB, Kim TW. Optimizing conditions in the acid tolerance test for potential probiotics using response surface methodology. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(4):e01625-22.
23. Sankarapandian V, Venmathi Maran BA, Rajendran RL, Jogalekar MP, Gurunagarajan S, Krishnamoorthy R, Gangadaran P, Ahn BC. An update on the effectiveness of probiotics in the prevention and treatment of cancer. *Life*. 2022;12(1):59.
24. Wang L, Li S, Fan H, Han M, Xie J, Du J, Peng F. *Bifidobacterium lactis* combined with *Lactobacillus plantarum* inhibit glioma growth in mice through modulating PI3K/AKT pathway and gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13:986837.
25. Tuo Y, Song X, Song Y, Liu W, Tang Y, Gao Y, Jiang S, Qian F, Mu G. Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to

inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. *Journal of dairy science*. 2018;101(6):4822-9.

26. da Silva Sabo S, Vitolo M, González JM, de Souza Oliveira RP. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*. 2014;64:527-36.

27. Martinez FA, Domínguez JM, Converti A, de Souza Oliveira RP. Production of bacteriocin-like inhibitory substance by *Bifidobacterium lactis* in skim milk supplemented with additives. *Journal of Dairy Research*. 2015;82(3):350-5.

28. Dikbaş N, Orman YC, Alım Ş, Uçar S, Tülek A. Evaluating *Enterococcus faecium* 9 N-2 as a

probiotic candidate from traditional village white cheese. *Food Science & Nutrition*. 2024;12(3):1847-56.

29. Dumitru M, Rizea D, Ciurescu G. Evaluation of the probiotic potential of NCIMB 11181 as a possible candidate in animal nutrition. *Archiva Zootechnica*. 2023;26(1):114-27.

30. Jawan R, Abbasiliasi S, Mustafa S, Kapri MR, Halim M, Ariff AB. In vitro evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2021;13:422-40.

Identification of new species of *Enterococcus* with probiotic properties from traditional Iranian dairy sources

Nasrin Seyed Ghaleh¹, **Keyvan Beheshti-Maal^{1*}**, Ramesh Monajemi², Ali Mohammad Ahadi³

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3. Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

Finding new probiotic strains can help in achieving nutritional and therapeutic goals due to their consumption. The purpose of this study was to isolate probiotics from traditional dairy products of cities in Isfahan. Lactic acid bacteria were isolated from traditional dairy sources. Probiotic characteristics of the isolates was evaluated by carrying out bile salt tolerance tests, acid tolerance tests and checking their hemolytic activity. The ability of adhesion and biofilm formation as well as the antimicrobial activity of probiotic isolates was determined against pathogenic isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In order to definitively identify the isolates, colony PCR was performed using general primers designed in the 16S rRNA gene, and the gene sequences of the strains were registered in the world bank. Three strains of *Enterococcus faecium* were isolated and identified from the dairy products that were able to grow in the pH values of 3 and 4.5 as well as the ability to grow in 0.3% bile salt. None of the strains had the ability of adhesion and biofilm formation. All the strains had antimicrobial activity against pathogenic isolates, without any significant differences, with inhibition zones diameters of 12 to 16 mm. The isolated strains were registered in NCBI database with the accession numbers MZ853942, MZ854204, and MZ902025. Considering the confirmation of the probiotic properties of the local isolated strains, it is recommended to use them in the production of food complements and probiotic starter cultures.

Key words: lactic acid bacteria, probiotics, local dairy products, *Enterococcus faecium*

* kbeheshtimaal@yahoo.com