جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی سبزوار

وحید کوشکی[1]، جعفر وطن دوست[2]، سید علی مرتضوی[3]، علی اکبر جنت آبادی[4]، سید ابولفضل حسینی[2]

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه علوم و صنایع غذایی

[2] استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه حکیم سبزواری، دانشگاه آزاد اسلامی سبزوار.

[3] استاد دانشگاه فردوسی مشهد، گروه علوم و صنایع غذایی

[4] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه دامپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

نشانی نویسنده مسول: دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دکتر جعفر وطن دوست
Email: j.vatan@hsu.ac.ir

وصول:۹۲/۸/۱۲، اصلاح:۹۲/۱۰/۲۲، پذیرش:۹۲/۱۱/۲۸

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های غیر پاتوژن و مفیدی هستند که شناسایی آنها در محصولات لبنی سنتی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتریهای پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی برای تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که به طور طبیعی حاوی باکتریهای پروبیوتیکی هستند به ما عرضه کند.

مواد و روش ها: پس از نمونه برداری محصولات لبنی از مناطق مختلف شهرستان، کشت‌های متوالی بر روی محیط‌های اختصاصی MRS Broth و MRS انجام شد. شناسایی اولیه با رنگ آمیزی گرم، تست حرکت، تست احیای نیترات، رشد در دمای ^{o}C ۱۵ و ۴۵، رشد در pH=۹/۶ و همچنین قابلیت تخمیر ۱۱ قند بررسی شد. جهت تعیین دقیق سویه مورد نظر، ژن 16S rDNA با جفت آغازگرهای اختصاصی توسط PCR تکثیر داده شد و تعیین توالی گردید. توالی های حاصل بعد از ویرایش، بلاست نوکلئوتیدی شدند. در پایان تست تحمل شرایط اسیدی و صفراوی نیز برای نمونه های مثبت مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: پس از انجام کشت‌های متوالی بر روی محیط‌های آگار اختصاصی، ۱۶ سویه باکتری برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. در شناسایی اولیه سویه‌ها توسط روش‌های فنوتیپی، ۱۴ نمونه مثبت بودند که سپس برای شناسایی دقیق‌تر، ژن 16S rDNA تمام نمونه ها با PCR تکثیر داده شد. بعد از شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن 16S rDNA، بلاست توالی ها شباهت بالای نمونه ها با Lactobacillus plantarum را نشان داد. نتایج تحمل شرایط اسیدی و صفراوی نیز نشان داد که این باکتریها بهترین رشد را در pH=۴ دارا می‌باشند و سویه مورد نظر توانایی رشد در حضور نمک صفراوی را دارد.

نتیجه گیری: نتایج بیوشیمیایی نشان داد که سویه رایج در محصولات مورد بررسی لاکتوباسیلوس است که تست‌های مولکولی و تعیین توالی نیز وجود L. plantarum را در محصولات مورد نظر تایید نمود. همچنین تست تحمل شرایط اسیدی و صفراوی بعنوان مهمترین خصوصیت باکتریهای پروبیوتیک نشان داد که سویه مورد نظر توانایی تحمل این شرایط را دارا می‌باشد.

کلمات کلیدی: *پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، 16S rDNA، محصولات لبنی سنتی*

مقدمه

واژه پروبیوتیک از واژه یونانی پروبیوس به معنای حیات بخش یا زیست بخش اقتباس شده است و از نظر مفهوم در مقابل واژه پادزیست به معنای ضدحیات قرار دارد. طبق تعاریف مختلف، پروبیوتیک را می‌توان به عنوان میکروارگانیسم زنده ای تعریف کرد که می تواند برای سلامت انسان/حیوان به دلیل حفظ و بهبود تعادل میکروبی محیط روده مفید باشد. پروبیوتیک ها با تعدیل ایمنی، کاهش کلسترول، بهبود تحمل لاکتوز و جلوگیری از برخی سرطان ها نقش درمانی موثری را ایفا می‌کنند. همچنین پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های غیر پاتوژن و مفیدی هستند که با توجه به خصوصیاتی نظیر تولید مواد ضد میکروبی و همچنین دوام آنها در دستگاه گوارشی به علت مقاومت به املاح صفراوی می‌توانند گزینه مناسبی برای جایگزین شدن با داروهای آنتی‌بیوتیکی باشند [۱].

گوناگونی ریززنده های پروبیوتیک همواره در حال افزایش بوده است، بدین معنا که پژوهش های نوین به شناخت نژادها، گونه ها و جنس های جدیدی از ریززنده ها که دارای خواص پروبیوتیکی هستند منجر می شوند. مهم ترین ریززنده هایی (در مورد انسان و حیوان) که در منابع گوناگون تحت عنوان پروبیوتیک از آن ها یاد می شود را می توان در چهار دسته جنس لاکتوباسیلوس، جنس غیر لاکتوباسیلوس، جنس بیفیدوباکتریوم و سایر پروبیوتیک ها خلاصه کرد. مهم ترین و مرسوم ترین پروبیوتیک ها به جنس های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم تعلق دارند. لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتریوم ها فلور طبیعی دستگاه گوارش هستند و در درمان و پیشگیری از بیماری های گوارشی نقش مهمی ایفا می کنند [۲].

لاکتوباسیلوس ها متعلق به خانواده Lactobacillaceae و جزء باکتریهای گرم مثبت فاقد اسپور می باشند [۳]. این باکتری ها کاتالاز منفی و معمولاً نامتحرک بوده و قادر به احیای نیترات نیستند. در بدن حیوانات و انسان به عنوان فلور طبیعی زندگی می کنند و به نمک و پادزیست به طور نسبی مقاومند [٤]. بر اساس الگوی تخمیر گلوکز به دو دسته همگون – تخمیر و ناهمگون – تخمیر قابل تقسیم هستند. دسته نخست، گلوکز را از مسیر گلیکولیز که شامل تبدیل گلوکز به دو مولکول پیرووات و سپس دو مولکول اسید لاکتیک همراه با ۲ATP است، تخمیر می کنند. دسته دوم، از مسیر پنتوز – فسفات که در آن یک مولکول گلوکز به مولکول های لاکتات، CO_2 ، اتانل و ۱ ATP تبدیل می شود، رشد ونمو می کنند [۵].

لاکتوباسیل ها همچنین باکتری های میله ای شکل به طول ۱۰-۱ و عرض ۱/۲-۰/۵ میکرون می باشند. این باکتری ها همین (سیتوکروم-کاتالاز) ندارند ولی میکروآئروفیل بوده و در حضور هوا رشد کمی دارند. وجود ۵٪ دی اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آنها می شود. دمای بهینه رشد آنها بین ^{o}C ٤٠-۳۰ می باشد اما توانایی رشد تا دمای ^{o}C ۵۳-۵۰ را دارا می باشند [۳, ٤]. لاکتوباسیل ها قدرت تحمل اسید را در محیط داشته و گرچه pH بهینه برای رشد آنها ۵/۵ تا ۵/۸ می باشد اما بطور کلی در pH کمتر از ۵ نیز قادر به رشد هستند. لاکتوباسیل ها برای تامین انرژی، هیدرات های کربن را مورد استفاده قرار داده، اسید لاکتیک تولید می کنند. برخلاف آنتروباکتریاسه که آنها هم اسیدلاکتیک تولید می کنند، لاکتوباسیل ها تخمیر کننده اجباری هستند [٦, ۷].

جنس لاکتوباسیلوس شامل گونه های متنوعی می باشد و تقریباً ۵۹ گونه از این جنس تاکنون شناسایی شده است. گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازیی، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس برویس از مهم ترین گونه های موجود در دستگاه گوارش انسان هستند. شناسایی فنوتیپی مرسوم لاکتوباسیلوس ها، بسیار خسته کننده و وقت گیر است و همیشه قابل اعتماد نیست زیرا

پاسخهای فنوتیپی می تواند تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گیرد. علاوه بر این گونه های خاصی وجود دارند که قابل شناسایی بر اساس صفات فنوتیپی نیستند [۸]. لذا جهت طراحی روشهای شناسایی پایدارتر و قابل اعتمادتر، بایستی تستهای ژنتیکی نیز به کار رود.

لطفی و همکارانش باکتریهایی با پتانسیل پروبیوتیکی از فلور موجود در ماست و پنیر سنتی مناطق هریس و سراب را توسط روشهای فنوتیپی جداسازی کردند و شاخص های اولیه پروبیوتیکی آنها را مورد ارزیابی قرار دادند. سپس برای شناسایی دقیق تر ، ژن 16S rDNA باکتری های لاکتوباسیلوس و انتروکوکسی تکثیر داده شد [۹]. در تحقیق دیگری با هدف جداسازی لاکتوباسیل های با توانایی های پروبیوتیکی از پنیر سنتی موجود در بازار تبریز، به طور تصادفی ۵۰ نمونه از سطح شهر تبریز جمع آوری گردید. بعد از ارزیابی فلور میکروبی برای تحمل شرایط اسیدی و صفراوی، شناسایی مولکولی در حد گونه به روش ARDRA صورت گرفت. بعد از انجام ARDRA دو جدایه تعیین توالی گردیدند که به L. Fermentum و L. Plantarum تعلق داشتند [۱۰]. در تحقیقی با هدف شناسایی و جداسازی لاکتوباسیلوس-ها از ماست سنتی کازرون، شناسایی اولیه توسط روشهای فنوتیپی صورت گرفت و گونه‌های L.plantarium، L.casei و L.brevis مورد شناسایی قرار گرفتند [۱۱]. در تحقیقی با جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک شده از ۲۱۵ نمونه پنیر لیقوان، جدایه ها به L.Plantarum و L.Casei شباهت داشتند [۱۲].

با توجه به سودمندی های ذکر شده در مورد باکتریهای پروبیوتیک و همچنین به خاطر روند رو به رشد مصرف محصولات لبنی و افزایش استفاده از محصولات لبنی به عنوان ابزاری برای انتقال میکروارگانیسم های پروبیوتیک به دستگاه گوارشی، از این رو جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتری‌های پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی برای تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که به طور طبیعی حاوی باکتری‌های پروبیوتیکی هستند به ما عرضه کند. هدف ما نیز در این تحقیق، جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتریهایی با پتانسیل پروبیوتیکی از فلور موجود در محصولات لبنی سنتی شهرستان سبزوار بود تا با شناسایی پتانسیل پروبیوتیکی سویه های بومی به منظور امکان استفاده در محصولات لبنی صنعتی معرفی گردند.

مواد و روشها

نمونه برداری

نمونه برداری بصورت تصادفی در فصل پاییز و از مناطق روستایی که بیشترین میزان دام و بیشترین میزان تولید محصولات لبنی کمه و شیر را داشتند صورت گرفت. در این تحقیق ۱۵ منطقه جغرافیایی با میزان بالای دام و محصولات لبنی از روستاهای شهرستان سبزوار انتخاب شدند. از هر منطقه چند نمونه از دو نوع فراورده لبنی سنتی (کمه و شیر) تهیه و نام گذاری شدند. سپس نمونه ها تحت شرایط سردخانه (دمای ٤ oC) به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردیدند.

ایزولاسیون (آماده سازی نمونه ها) و شناسایی جدایه های باکتریایی

رقت سازی نمونه‌های شیر مستقیما در آب پپتونه ۰/۱٪ صورت گرفت اما برای نمونه‌های کمه و به منظور تهیه سوسپانسیونی همگن، ۲۵ گرم نمونه کمه داخل کیسه‌های استریل حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول استریل سیترات سدیم ۲ درصد وزنی- حجمی ساخت شرکت سیگما منتقل گردید و به مدت ۵ دقیقه با هم زدن بطور کامل هموژن و سپس فیلتر شد تا ذرات معلق آن حذف شود. به این ترتیب اولین رقت ۱-۱۰ تهیه گردید. سایر رقت‌ها (۲-۱۰ تا ۵-۱۰) با استفاده از آب پپتونه استریل ۰/۱ درصد وزنی- حجمی تهیه شدند. سپس از لوله های حاوی رقت های تهیه شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به

محیط کشت MRS مایع اضافه گردید. بعد از ۲٤-٤۸ ساعت گرمخانه گذاری (ممرت آلمان مدلIPP400) در شرایط بی هوازی در دمای ۳۷ °C و در حضور ۵-۱۰٪ دی اکسیدکربن، از کشت تازه میکروب ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به وسیله سمپلر روی سطح محیط کشت MRS، کشت سطحی به منظور جداسازی لاکتوباسیل ها انجام شد [۱۳]. به منظور جلوگیری از رشد کپک و مخمر در محیط کشت، سیکلوهگزامید به میزان ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر اضافه شد [۱٤].

آزمونهای بیوشیمیایی و تست های تاییدی

کلنی های خالص بدست آمده در هر پلیت مورد آزمونهای رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست اکسیداز و مشاهده مورفولوژی [۱۵, ۱٦] در زیر میکروسکوپ قرار گرفتند. ابتدا آزمون گرم، کاتالاز و اکسیداز بر روی هر کلنی خالص بدست آمده صورت گرفت. پس از اطمینان از گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی بودن جدایه مورد نظر، خصوصیات مورفولوژی سلولی در زیر میکروسکوپ بررسی گردید و باسیلی بودن آن تایید گردید. سپس تست رشد در دمای ۱۵ و ٤۵ °C، تست احیای نیترات، رشد در pH= ۹/٦، تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکز در محیط MRS broth در لوله دورهام جهت تشخیص همو یا هترو فرمانتاتیو بودن و آزمون وژس پرسکوئر (VP) در محیط MR-VP به عنوان تست های تائیدی صورت گرفتند [۱۵, ۱٦].

در پایان، پس از شناسایی جدایه ها در سطح جنس با استفاده از تست های بیوشیمیایی و تاییدی، آزمون تخمیر قند و کربوهیدرات به روش ذیل صورت پذیرفت [۱۵, ۱٦]. تخمیر قندهای مختلف در محیط پایه MRS مایع بدون گلوکز و عصاره گوشت، اما حاوی ۱٪ هیدرات های کربن مختلف گلوکز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز، ساکارز، ملیبیوز، رافینوز، زایلوز، ریبوز، آرابینوز و گلوکونات بررسی گردید. برموکرزول پرپل نیز به عنوان شناساگر به محیط اضافه گردید.

شناسایی مولکولی باکتری ها

استخراج DNA

برای شناسایی باکتری ها به روش مولکولی، ابتدا استخراج DNA به روش عمومی استخراج باکتری های گرم مثبت با اندکی تغییرات صورت گرفت [۱۷]. ابتدا باکتری روی محیط نوترنیت آگار کشت چمنی شد. پس از آنکه به صورت شبانه در دمای ۳۷ °C انکوبه شد، باکتریهای کشت شده به کمک لوپ از سطح محیط کشت جمع آوری و سوسپانسیونی از آن در آب مقطر تهیه شد. با سانتریفیوژ (Hettich, Mikro 200R) سوسپانسیون حاصل دردمای ٤ °C به مدت ۱۵دقیقه و در دور ۵۰۰۰g رسوبی از باکتری حاصل شد. حداقل دوبار این رسوب با دور ریختن محلول رویی و اضافه نمودن آب مقطر سترون شده و سانتریفوژ مجدد شسته شد. سوسپانسیون مجددی از باکتری در حجم ۱ میلی لیتر بافر۵۰ میلی مولار تریس،۵۰ میلی مولار EDTA (pH=8) تهیه و در دمای C ۲۰- ○ به مدت دو ساعت منجمد شد. به سوسپانسیون سلولی منجمد شده به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول۲۵۰ میلی‌مولار تریس (pH=8.0) و ۱۰mg/ml لیزوزیم اضافه شده و پس از ذوب شدن در دمای محیط به مدت ٤۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۵٪ SDS، ۵۰ میلی مولار تریس، ۰/٤ میلی مولار EDTA (pH=8) و 1 mg/ml پروتئیناز K به آن افزوده و در حمام آب گرم ۵۰ °C برای یک ساعت انکوبه شد.

به هر ویال ٦۰۰ میکرولیتر از فنل استوک اضافه گردید. سپس در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و مایع رویی به اپندرف جدید منتقل شد. به میزان ۰/۱ حجم محلول حاصل، محلول ۳M نمک سدیم استات اضافه و به آرامی مخلوط شد. سپس دوبرابر حجم آن اتانل مطلق اضافه گردید و از طریق معکوس کردن مخلوط شد. به منظور رسوب دادن بهتر DNA، محتوی لوله ها به مدت دو ساعت در C ۲۰- ○

قرارداده شد و پس از سانتریفوژ در rpm ۱۲۰۰۰ بمدت ۱۰ دقیقه در C° ٤ سانتریفوژ و با اتانل ۷۰٪ شسته شده و مجددا به همان ترتیب سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن محلول رویی رسوب حاصل خشک و در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

با توجه به اطلاعاتی که از محاسبات مربوط به DNA الگو و پرایمرها به دست آمده است، PCR اختصاصی از DNA ژنومی استخراج شده از سویه های مورد نظر در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵µl با دستگاه ترمال سایکلر (Biorad, i cycler) انجام شد. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه 16S rRNA، پرایمرهای اختصاصی 8F و 1492R بر مبنای سویه های لاکتوباسیلوس بود. پرایمرهای طراحی شده با استفاده از نرم افزار Gene Runner از نظر تشکیل ساختارهای ثانویه و دایمر شدن بررسی شدند. اختصاصی بودن پرایمرها نیز توسط نرم افزار آنلاین Blastn ارزیابی گردید.

ارزیابی توانایی رشد در محیط کشت اسیدی و محیط کشت حاوی صفرا

دو ویژگی تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمکهای صفراوی جزء مهمترین خصوصیات باکتریهایی پروبیوتیک محسوب می شوند. لذا با توجه به اینکه باکتری در دستگاه گوارش در معرض pH اسیدی معده و همچنین نمکهای صفراوی کیسه صفرا قرار می گیرد، در این تحقیق جهت تشخیص پتانسیل پروبیوتیکی سویه های ایزوله شده، تحمل و مقاومت ایزوله ها نسبت به این شرایط مورد آزمایش قرارگرفت. بدین منظور از محیط MRS با pH=٦/٤ به عنوان نمونه شاهد استفاده شد و جهت کاهش pH و تهیه محیط MRS با pH های ۲، ۳ و ٤ از اسید کلریدریک ۸ نرمال استفاده گردید. آزمون طبق روش هوک و همکارانش صورت گرفت [۱۸].

از طرفی توانایی کلیهٔ جدایه های مورد مطالعه برای رشد در محیط MRS حاوی نمکهای صفراوی نیز ارزیابی شد. آزمون به روش هوک و همکارانش صورت گرفت [۱۸] و برای هر لوله یک گروه شاهد فاقد عصاره صفرا در نظر گرفته شد. در این آزمون، بایل یک ماده شیمیایی است که از رشد بسیاری از باکتری ها بخصوص در غلظتهای بالا جلوگیری می کند.

آنالیز آماری

داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی نمونه ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن Q =1 % انجام شد. درصد تشخیص و ارزش E هر بلاست از فاکتورهای مهمی بود که در نظر گرفته شد به طوری‌که مقدار E نشان دهنده معنی دار بودن شباهت از نظر آماری است.

نتایج و بحث

نمونه برداری و جداسازی جدایه های باکتریایی

نمونه برداری طبق بخش مواد و روش ها انجام شد. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه و کشت در محیط اختصاصی، از بین کلیهٔ پلیت‌های تلقیح شده، پلیت هایی که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه سفیدرنگ کوچک، محدب و براق بودند، انتخاب شده و از کلیهٔ پرگنه های قابل دسترس نمونه برداری انجام پذیرفت. سپس حدود یک ماه روند کشت دادن بر روی پلیت‌ها و خالص سازی ادامه پیدا کرد تا اینکه پلیت‌ها حاوی حداکثر تعداد ممکن از کلنی‌های مورد نظر ما شود.

آزمونهای بیوشیمیایی و تست های تاییدی

جهت شناسایی باکتری ها، انجام تست های شناسایی بر اساس روش برگی صورت گرفت(۱۹). کلونی های خالص بدست آمده درهر پلیت مورد آزمونهای رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست اکسیداز و مورفولوژی در زیر میکروسکوپ قرار گرفتند. ابتدا آزمون گرم، کاتالاز و اکسیداز بر روی هر کلونی خالص بدست

جدول۱: نتایج تست های بیوشیمیایی

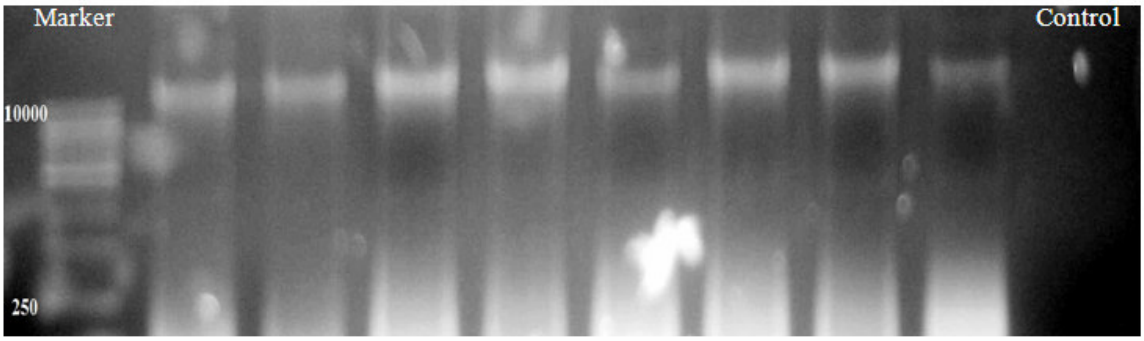
سویه ها	رشد در ۱۵ °C	رشد در ۴۵ °C	تولیدگاز ازگلوکز	احیای نیترات	آزمون vp	رشد در PH=9/6	آزمون حرکت	آزمون گرم	تست کاتالاز	تست اکسیداز
A1	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
A2	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
A3	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
A4	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
B1	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
B2	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
B3	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
B4	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
C1	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
C2	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
C3	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
C4	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
D1	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
D2	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
D3	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
D4	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+

جدول۲: نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها و تولید گاز از گلوکونات

تخمیر هیدراتهای کربن نام سویه	گلوکز	مانیتول	سوربیتول	لاکتوز	ساکارز	ملیبیوز	رافینوز	زایلوز	ریبوز	آرابینوز	تولیدگاز ازگلوکونات
A1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
B3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
C2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
C4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D3	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
D4	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+

آمده صورت گرفت. پس از اطمینان از گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی بودن جدایه مورد نظر، خصوصیات مورفولوژی سلولی در زیر میکروسکوپ بررسی گردید و باسیلی بودن آن تایید گردید. تست رشد در دمای ۱۵ °C و ٤٥ ، تست احیای نیترات، رشد در pH=9/6، تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکز در MRS broth در لوله دورهام جهت تشخیص همو یا هترو فرمانتاتیو بودن و آزمون وژس پرسکوئر (VP) در محیط MR-VP به عنوان تست های تائیدی صورت گرفتند (جدول ۱).

در پایان، پس از شناسایی جدایه ها در سطح جنس با استفاده از تست های بیوشیمیایی و تاییدی، آزمون تخمیر قند و کربوهیدرات به روش ذیل صورت پذیرفت. تخمیر قندهای مختلف در محیط پایه MRS مایع بدون گلوکز و عصاره گوشت، اما حاوی ۱٪ هیدرات های کربن مختلف گلوکز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز،



شکل ۱: نتایج استخراج DNA، ردیف اول مارکر 1kb فرمنتاز، ردیف ۲-۹ نتایج استخراج چند نمونه و ردیف ۱۰ نمونه کنترل منفی

جدول ۳: توالی نوکلئوتیدی پرایمرهای اختصاصی 8F و 1492R برای تکثیر ناحیه 16S rDNA سویه های لاکتوباسیلوس

توالی نوکلئوتیدی	نام پرایمر	پرایمر	
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8F	پرایمر پیشرو	(Forward)
CTACGGTTACCTTGTTACGAC	1492R	پرایمر معکوس	(Reverse)

جدول ٤: مشخصات مخلوط واکنش PCR

اجزای واکنش	غلظت استوک	غلظت نهایی	مقدار مورد استفاده در حجم ۲۵ µl
ddH_2O	---	-	-
PCR buffer	10 X	1X	2.5
$MgCl_2$	50 mM	1.5 – 2 mM	1
dNTP	10 mM	200 µM	0.5
Primer F	10 pmol	0.1-0.5 µM	1.2
Primer R	10 pmol	0.1-0.5 µM	1.2
DNA	---	20 ng	1
Taq polymerase	50 u/µl		0.5

ساکارز، ملیبیوز، رافینوز، زایلوز، ریبوز، آرابینوز و گلوکونات بررسی گردید. برموکرزول پرپل نیز به عنوان شناساگر به محیط اضافه گردید (جدول ۲).

شناسایی مولکولی باکتری ها

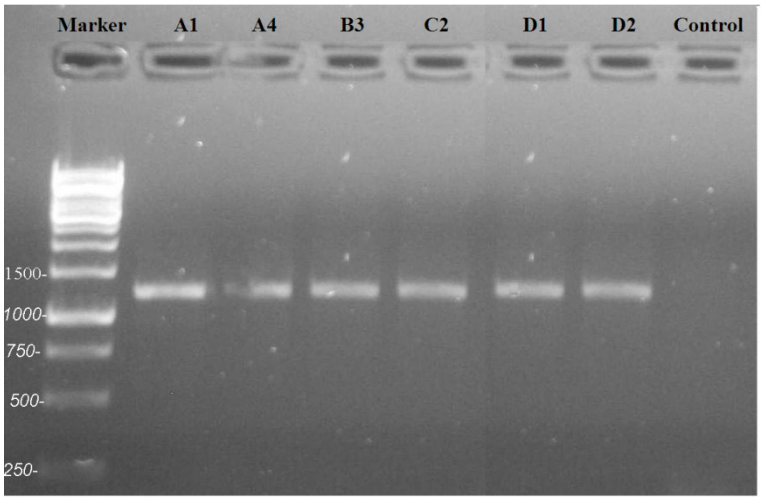
استخراج DNA

استخراج DNA براساس روش ذکر شده در مواد و روش ها انجام پذیرفت. DNA استخراج شده از نمونه‌ها، روی ژل الکتروفورز ۱ درصد آگارز برده شد تا از استخراج صحیح اطمینان حاصل شود (شکل ۱).

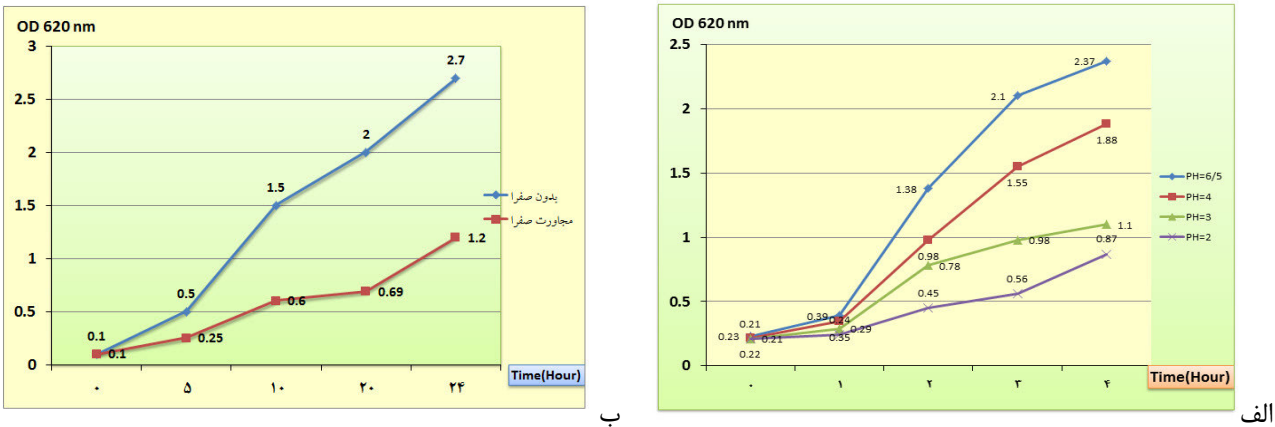
واکنش زنجیره ای پلیمراز

DNA های استخراج شده با استفاده از پرایمرهای طراحی شده عمومی برای 16S rDNA مورد آزمون PCRقرار گرفتند. پرایمرهای طراحی شده برای تکثیر ناحیه 16S rRNA، پرایمرهای اختصاصی 8F و 1492R بر مبنای سویه های لاکتوباسیلوس بود که ترادف آنها در جدول ۳ ارائه شده است. محصول PCR با این جفت پرایمرهای اختصاصی، قطعه ای به حدود ۱۵۰۰ bp است. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از پرایمرها و مواد جدول ۳ با شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در $95\ ^{\circ}C$ به مدت ۳ دقیقه، سپس سی چرخه شامل ۵۵ ثانیه در $95\ ^{\circ}C$، ۳۰ ثانیه در $52\ ^{\circ}C$ و ۹۰ ثانیه در $72\ ^{\circ}C$ انجام شد. پس از این مراحل نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای $72\ ^{\circ}C$ به منظور حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها قرار گرفتند. روش کار و غلظت مواد مصرفی برای تمامی سویه‌ها یکسان بود.

جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از بافر TAE 1X استفاده گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد و در دستگاه ژل نگار مورد بررسی قرار گرفت. باند حدود ۱۵۰۰ جفت بازی مورد نظر است. تکرارهای



شکل ۲: نتایج حاصل از PCR ژن 16S rRNA از ٦ سویه A1، A4، B3، C2، D1 و D2 (نمونه های فاقد باند نشان داده نشده اند)



الف ب

شکل ۳: نتایج تست تحمل شرایط اسیدی (الف) و تست تحمل شرایط صفراوی (ب)

متوالی و تغییر شرایط (گرادیان دمایی، گرادیانDNA، گرادیان Mgcl2) با هدف باند گرفتن از سویه ها انجام شد. در واکنش PCR از ١٤ سویه مورد آزمایش، ٦ سویه A1، A4، B3، C2، D1 و D2 با پرایمر اختصاصی 16S rRNA لاکتوباسیلوس ها، تشکیل باند دادند (شکل ۲). با بررسی نتایج تست های بیوشیمیایی و تخمیر قندها مشخص شد که این ٦ سویه تست‌های اولیه قابل اطمینان تری نسبت به بقیه سویه‌های مورد آزمایش دارند.

پس از تائید مقدماتی قطعه تکثیر شده ژن 16S rDNA بر روی ژل آگارز، DNA تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت M.W.G آلمان فرستاده شد. تعیین توالی نمونه ها براساس روش سنگر و بصورت اتوماتیک با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 8F و 1492R ارسالی انجام شد. توالی های تعیین شده با استفاده از نرم افزار Chromas بازنگری شد و با توجه به تداخل طول موج های نوکلئوتیدها در ابتدا و انتهای هر توالی، چندین نوکلئوتید ابتدا و انتهای هر توالی حذف گردید. برای تائید ترادف توالی قطعه تکثیر شده، توالی 16S rDNA نمونه تعیین توالی شده جهت بلاست در کتابخانه ژنی مورد استفاده قرار گرفت. باکتری هایی که توالی قطعه 16S ریبوزومی آنها در کتابخانه ژنی با قطعه تعیین توالی شده نمونه آزمایشی جفت گردید مد نظر بودند. نتایج بدست آمده نشان داد که این توالی ها با توالی 16S rRNA ثبت شده از سویه Lactobacillus plantarum در بانک ژنی NCBI همولوژی بالایی دارد.

ارزیابی توانایی رشد در محیط کشت اسیدی و محیط

کشت حاوی صفرا

بعد از تعیین توالی سویه مورد نظر و مشخص شدن اینکه لاکتوباسیلوس می باشد، اقدام به ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه مورد نظر گردید. نتایج حاصل از تست تحمل اسید و صفرا در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که سویه موردنظر بهترین رشد را در pH=۴ دارا می‌باشد و رشد درpH=۲ به طرز چشمگیری کاهش پیدا کرده است. نتایج مربوط به رشد در حضور ۰/۳ درصد نمک صفراوی نیز نشان داد که سویه مورد نظر توانایی رشد با حضور این نمک را دارد ولی رشد سویه مورد نظر کاهش چشمگیری پیدا کرده است.

بحث

تمامی ١٤ سویه جدا شده متعلق به باکتری های اسید لاکتیک و جنس لاکتوباسیل بودند به این ترتیب که همه میله ای گرم مثبت، اکسیداز منفی، بدون حرکت، کاتالاز منفی و قادر به احیا نیترات نمی باشند. از طرفی تخمیر ۱۱ قند و محصولات تخمیر و رشد در ○C ۱۵ و ٤٥ به عنوان کلید فنوتیپی برای تشخیص سویه ها استفاده شد که نتایج نشان می دهد که بیشتر سویه های جدا شده قادر به تخمیر گلوکز هستند.

در منابع مختلف برای جداسازی باکتری ها از محیط کشت MRS استفاده شده و گرمخانه گذاری در دمای $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ٢٤-٤٨ ساعت گزارش شده بود [۲۰, ۲۱]. در این تحقیق نیز با استفاده از محیط کشت مذکور کلنی های تیپیک و خالص لاکتوباسیل بدست آمد. روش مرسوم در شناسایی لاکتوباسیل ها پس از جداسازی، آنالیز خصوصیات بیوشیمیایی آنها از جمله تخمیر قند ها است. در مورد شناسایی لاکتوباسیل ها از تخمیر قند ها استفاده می شود اما در منابع مختلف تعداد قندها و نوع آنها متفاوت می باشد، مثلا برخی مانند چاماس از کیت API استفاده نموده [۲۱] و برخی دیگر بدون کیت تخمیر قندها را مورد بررسی قرار داده اند [۲۲, ۲۳]. Fitzsimons در سال ۱۹۹۹ برای شناسایی لاکتوباسیل ها، تنها تخمیر هشت قند گلوکز، رامنوز، سلوبیوز، ملیبیوز، مانیتول، ریبوز، رافینوز و مانوز را آزمایش کرد [۲۲]. Ayhan و همکاران در سال ۲۰۰۵ تخمیر پنج قند اینولین، سالیسین، سوربیتول، مانیتول و لاکتوز را بررسی نمودند [٢٤]. پوراحمد و اسدی در سال ۲۰۰۷ نیز تنها تخمیر هشت قند: گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، سوکروز، مالتوز، مانوز، تره هالوز و مانیتول را بررسی کردند [۲۳]. در بهترین گزارشات، Scheirlinck و Vandamme در سال ۲۰۰۷ تخمیر ۱۹ قند: آمیگدالین، آربوتین، گالاکتوز، سلوبیوز، لاکتوز، مانیتول، سوکروز، ملزیتوز، ملیبیوز، رافینوز، رامنوز، سوربیتول، تره هالوز، مالتوز، ریبوز، جنتیبیوز و تاگاتوز را انجام دادند.

در این تحقیق نیز از تخمیر ۱۱ قند گلوکز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز، ساکارز، ملیبیوز، رافینوز، زایلوز، ریبوز، آرابینوز و گلوکونات برای شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس‌ها استفاده شد. با مقایسه نتایج شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های مورد بررسی با جداول مندرج در کتاب برگی، سویه شناخته شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود. در این بین هرچند سویه D3 شبیه به لاکتوباسیلوس پلانتاریوم بود اما قادر به تخمیر قندهای رافینوز و ملیبیوز نمی باشد. همچنین قند آرابینوز را که سویه‌های پلانتاریوم قادر به تخمیر آن نیستند سویه‌های D3 و D4 تخمیر می‌کنند.

آن چه مسلم است تست های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی محدودیت هایی دارد و در بین تعداد زیادی جدایه، خصوصیات فیزیولوژیکی مشابه ای دیده می شود. بعلاوه نتایج این روش ها همیشه دقیق نیست و جزئیات نتایج تنوع میکروب در فراورده های شیری تخمیر شده را نشان می دهد. چون این نتایج فقط بر پایه ی روش های کشت و خصوصیات فنوتیپی هستند. به همین دلیل در منابع توصیه شده که از روش های ژنتیکی همراه با آزمون

های فنوتیپی برای تایید تشخیص سویه های جدا شده بهره گیری شود.

در استفاده از مارکرهای مولکولی برای شناسایی دقیق تر لاکتوباسیل‌ها، روش‌هایی از قبیل RAPD [۲۲]، هیبریداسیون DNA-DNA و همچنین مقایسه توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA [۲۰, ۲۱] وجود دارد که دو روش اخیر دقیق تر می‌باشد. در این تحقیق نیز خصوصیات فنوتیپی سویه ها در شناسایی باکتری ها نقش داشت اما در بعضی از موارد شناسایی فقط با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی ممکن نبود چون تخمیر قندها در بعضی از سویه‌ها دقیقا مشابه سویه خاصی در کتاب برگی نبود. لذا تکثیر ژن 16S rDNA با PCR اختصاصی و تعیین توالی آن جهت شناسایی دقیق تر نمونه ها انجام پذیرفت. توالی آن با توالی های باکتری های دیگر موجود در پایگاه داده های NCBI مقایسه شدند و بر اساس مشابهت توالی ژن 16S rDNA باکتری مورد آزمون این تحقیق با توالی باکتری‌های دیگر گزارش شده مشخص شد که باکتری مربوط به چه سویه ای است. بنابراین شناسایی مولکولی و شباهت توالی 16S rDNA باکتری ها نقش تعیین کننده ای در شناسایی باکتری ها دارد.

در فرآیند تکثیر و تعیین توالی ژنهای 16S rDNA، در مرحله اول از آغازگر های مخصوص شناسایی جنس استفاده شد. نتیجه این تکثیر یک قطعه حدودا bp ۱۵۰۰ بود که شناسایی بیوشیمیایی سویه‌ها را تایید نمود. به این ترتیب از ١٤ سویه مورد آزمایش، ٦ سویه پس از تکثیر با آغازگر جنس تشکیل باند دادند که از نظر واکنش های بیوشیمیایی نیز لاکتوباسیل شناخته شده بودند. پس از تعیین توالی 16S rDNA و بلاست آن در پایگاه اطلاعاتی NCBI با دیگر سویه های موجود، مشخص شد که سویه های تعیین توالی شده، لاکتوباسیلوس پلانتاریوم است.

اختلاف باکتری ها در مصرف قند و عدم انطباق برخی از آنها با جداول ارئه شده ممکن است ناشی از جهش در یک یا تعدادی از ژن های مربوط به آنزیم های حد واسط در تخمیر قندها باشد. شاید در طول تکامل و با توجه به شرایط محیطی این باکتری نیاز به تخمیر این قند نداشته است، بنابراین ژن مربوط به آن دچار جهش یا حذف شده باشد. به نظر می رسد که ثبات شرایط محیطی این باکتری ها که ناشی از باورهای افراد و خانواده ها است (حفظ سویه ها در درون یک خانواده و عدم تداخل با نمونه های سایر خانواده ها) موجب گردیده که باکتری نیاز به جبران یا اصلاح مسیر بیوشیمیایی نداشته باشد. اما مسئله مهم که در این تحقیق نیز ثابت شد این است که مطالعات مولکولی و مقایسه توالی DNA در مکانهای خاص مانند 16S rRNA می تواند بسیار دقیق تر از خصوصیات بیوشیمیایی در تشخیص گونه ها عمل کند.

باتوجه به افزایش روز افزون مصرف غذاهای آماده و فست فود و از طرفی عدم تمایل به استفاده از غذاهای محلی خصوصاً درنسل جوان، ضرورت شناسایی و جداسازی باکتریهای پروبیوتیک از چنین منابع غنی وحفظ آنها مشخص می شود و می تواند درجهت بهبود و افزایش کیفیت محصولات غذایی و زمان ماندگاری (به عنوان نگهدارنده های طبیعی) درمصارف صنعتی کاربردی شده و دردسترس عموم مردم جامعه قرار گیرد.

References

1. kailasapathy k, microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. Curr issues intest microbiol. 2002; 3(2): 39-48.
2. Lo PR, Yu RC, Chou CC, Huang EC. Determinations of the Antimutagenic Activities of Several Probiotic Bifidobacteria Under Acidic and Bile Conditions Against Benzo[a] Pyrene by a Modified Ames Test. Int J Food Microbiol 2004;93(2):249-57.
3. de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr. 2000. 71(2): 405-11.
4. Fook LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. Br J Nutr. 2002. 88(1): 39-49.

5. Lindgren SE, Dobrogosz WJ Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations.FEMS Microbiol Rev. 1990; 7(1-2): 149-63.
6. Holzapfel WHN, Wood BJ. The Genera of Lactic Acid Bacteria, Th Lactic Acid Bacteria. 1998; 2: 398.
7. Klaenhammer T, Altermann E, Arigoni F, Bolotin A, Breidt F, Broadbent J, Cano R, Chaillou S, Deutscher J, Gasson M, et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics.Antonie Van Leeuwenhoek. 2002; 82(1-4): 29-58.
8. Schleifer KH, Ehrmann M,Beimfohr C,Brockmann E,Ludwig W,Amann R. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. International Dairy Journal. 1995; 5(8): 1081-94.
9. Lotfi H, Hejazi M, Maleki Zanjani B, Barzegari A. Isolation, Biochemical and molecular identification of potentiallly probiotic bacteria from traditional dairy products from heris and sarab regions. journal of food research: agricultural scienc. 2010; 1(20).[Persian]
10. Mirzaei H, Barzgari A. Isolation and Molecular Study of Potentially Probiotic Lactobacilli in Traditional White Cheese of Tabriz in Iran. Annals of Biological Research. 2012, 3 (5):2213-6.
11. Azadnia P,Karimi Jashni M, Shah Ahmad Ghasemi M, Khalegh Babaki A, Zamani MH, Taarof N. Isolation and Identification of Mesophilic Lactobacilli from Traditional Yoghurts of Tribes of Kazerun. journal of animal and veterinary advances. 2011; 4: 528-31.
12. Abdi R, Sheikh-Zeinoddin M,Soleimanian-Zad S. Identification of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Iranian Lighvan Cheese. Pakistan Journal of Biological Sciences. 2006; 1: 99-103.
13. Hardie J, Whiley R. The genus streptococcus, in the genera of lactic acid bacteria. 1995, Springer. 55-124.
14. Edalatian MR, Habibi Najafi MB, Mortazavi SA, Alegria A, Nassiri MR, Bassami MR, Mayo B. Microbial diversity of the traditional iranian cheeses lighvan and koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. dairy science & technology, 2012; 92(1): 75-90.
15. Harrigan WF. Laboratory Methods in Food Microbiology. 1998: access online via elsevier.
16. Tabatabaee F, Alizadeh Behbahani B, Mohebbi M, Mortazavi SA, Ghaitaranpour A. Identification of lactic acid bacteria isolated from tarkhineh, a traditional iranian fermented food. Scientific Journal of Microbiology, 2012. 1(7): 152-9.
17. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual (3volume set). 2001.
18. Hoque MZ, Akter F, Hossain KM, Rahman MSM, Billah MM, Islam KMD. Isolation, identification and analysis of probiotic properties of lactobacillus spp. From selective regional yoghurts. World Journal of Dairy & Food Sciences, 2010; 5(1): 39-46.
19. Goodfellow M, Kmpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Suzuki KI, Ludwig W, Whitman WB. Bergey s manual of systematic bacteriology, Springer. 2012; 5.
20. Watanabe K, Fujimoto J, SasamotoM, Dugersuren J, Tumursuh T, Demberel Sh. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in airag and tarag, traditional fermented milk products of mongolia. world journal of microbiology and biotechnology. 2008. 24(8): 1313-25.
21. Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, Beal C. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk ' laban'. Int J Food Microbiol. 2006. 110(1): 52-61.
22. Fitzsimons N, Cogan T, Condon S, Beresford T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Applied and environmental microbiology, 1999; 65(8): 3418-26.
23. Pourahmad R, Mazaheri Assadi M. Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. Int J Dairy Technol. 2007; 60(4): 259-62.
24. Ayhan K, Durlu–Ozkaya F, Tunail N. Commercially important characteristics of turkish origin domestic strains of streptococcus thermophilus and lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus. Int J Dairy Technol. 2005; 58(3): 150-7.

Isolation, biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional dairy products of Sabzevar

Vahid Koshki,
MSc Student of Food science and technology, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Jafar Vatandoost,
Assistant professor of Dept. of Biology, Hakim Sabzevari University and Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Seyyed Ali Mortazavi ,
Professor of Dept. of Food Science & Technology, Ferdowsi Uinversity, Mashhad, Iran.

Aliakbar Jannatabadi,
Assistant professor of Dept. of Agriculture, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran.

Seyyed Abolfazl Hosseini
Assistant professor of Dept. of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Received:03/11/2013**, Revised:**12/01/2014**, Accepted:**17/02/2014

Corresponding author:
Sabzevar University of Hakim, Sabzevari, Faculty of Science, Department of Biological, dr jafar vatandoost
Email: j.vatan@hsu.ac.ir

Abstract

Background: Probiotics are beneficial and non-pathogenic microorganisms. Isolation of probiotic bacteria from traditional dairy products can not only lead to the isolation of probiotic bacteria with special characteristics, but it can offer a good approach for the mass production of traditional dairy products containing natural probiotic bacteria.

Materials and Methods: After collection of dairy products samples from different regions of Sabzevar, they were continuously cultured on the specific media of MRS and MRS Broth. Initial identification of isolates was performed by gram stain, motility test, nitrate reduction test, growth at 15 and 45 ℃, growth at pH: 9/6 and fermentation capability of 11 different sugars. To identify desired strains more precisely, the 16S rDNA gene was amplified by PCR with specific primers and then sequenced and BLASTed. Acidic and bile salts conditions tolerance tests were performed for the final confirmation of desired strains.

Results: After continuous culture on specific agar media, 16 strains for further analysis were selected. In early identification of isolates by phenotypic methods, 14 strains were positive. To identify these strains more precisely, the 16S rDNA gene was amplified. Following molecular identification and sequencing of 16S rDNA gene, the BLAST sequence similarities were found with *Lactobacillus planetarium*. In addition, acidic and bile salts conditions tolerance tests showed that these bacteria had the best growth pattern at PH: 4 and they were able to grow in the presence of bile salts.

Conclusion: Biochemical results showed that the most common strains in the tested dairy products are Lactobacillus. These results also confirmed by the molecular tests. Acidic and bile salts conditions tolerance test, as a main characteristic of probiotic bacteria, showed that the strain was able to withstand these conditions.

Keywords: *Probiotic, Lactobacillus, 16S rDNA gene, Traditional dairy products*