مقاله پژوهشی

غربال گری، شناسایی و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی انتروکوکسی های موجود در فرآورده لبنی سنتی سبزوار

سارا رشید [۱]،مهدی حسن شاهیان [۲]،محمدرضا سعیدی اصل [۳]،حسین استیری [۴]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد علوم تحقیقات سیرجان،سیرجان،ایران

[۲] استادیارگروه زیست شناسی،دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان،کرمان،ایران

[۳] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی ،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد سبزوار،سبزوار،ایران

[۴] مربی، گروه علوم و صنایع غذایی ،دانشگاه آزاد اسلامی،واحد سبزوار،سبزوار،ایران

نشانی نویسنده مسؤول: سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، سارا رشید

E-mail: rashid.sara88@gmail.com

وصول:۹۲/۹/۱۲، اصلاح:۹۲/۱۱/۷، پذیرش:۹۲/۱۲/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های مفیدی هستندکه اگر به تعداد کافی مورد استفاده قرار بگیرند دارای اثرات سلامت بخش خواهند بود. باتوجه به گسترش فزاینده محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی، امکان از دست دادن بسیاری از باکتری های پروبیوتیک وجود دارد. بنابراین ضروری است این باکتری ها را از منابع سنتی شناسایی نموده و در تولید محصولات لبنی استفاده نمود. بنابراین هدف از این تحقیق غربالگری و شناسایی انتروکوک ها از کمه (فراورده لبنی سنتی سبزوار) و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آن ها بود.

مواد وروش‌ها: در این مطالعه نمونه گیری از چهار روستای مختلف انجام شد. سپس نمونه های جمع آوری و برای غربالگری در pH=٤/٥ قر ار داده شد. توانایی سویه ها ی با قی مانده در pH برابر ٤ و غلظت ۰/۳٪ نمک صفرا ارزیابی شد. بررسی اثر ضد میکروبی سویه های غربال شده در مقابل پاتوژن های سالمونلا تیفی موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس با کمک روش دیسک پلیت سنجیده و در نهایت شناسایی سویه ها با روش PCR و تعین توالی انجام شد.

یافته ها: نتایج این پژوهش نشان داد که ۳ گونه متفاوت انتروکوک شامل E. faecium ، E. avium و E. faecalis در این فرآورده وجود دارد که دارای پتانسیل قوی پروبیوتیکی هستند به طوری که می توانند مقادیر بالای اسید و نمک صفراوی را تحمل کنند. کد E1 بیش ترین قدرت مقابله با پاتوژن ها را نیز به اثبات رسانید.

نتیجه گیری: این بررسی نشان داد که کمه دارای انتروکوک هایی با پتانسیل پروبیوتیکی مناسب است و می تواند در سایر محصولات لبنی به عنوان مکمل اضافه شود.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس، پروبیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم، کمه*

مقدمه

واژه پروبیوتیک از دو کلمه یونانی (پرو) و (بیوتیک) به معنی حیات بخش، منشاء گرفته است و عبارتند از میکرو ارگانیسم های زنده که وقتی در مقادیر

متعادل مورد استفاده قرار بگیرند، در سلامتی میزبان مفید خواهند بود(۱،۲،۳). تاکنون گونه های مختلفی از باکتری ها به عنوان پروبیوتیک معرفی شده اند ولی بیشتر پروبیوتیک های معرفی شده مربوط به جنس لاکتوباسیلوس ها بوده و کمتر به جنس انتروکوک ها توجه شده است. انتروکوک ها، کوکسی های گرم مثبت، فاقد اسپور و بی هوازی اختیاری هستند و در اثر فعالیتشان باعث افزایش طعم مواد غذایی می شوند(٤،٥). ازخصوصیات پروبیوتیک مناسب، می توان به تحمل اسید و صفرا، ممانعت از رشد باکتری های بیماری زا و تعدیل سیستم ایمنی اشاره کرد (٦). محصولات لبنی، اکوسیستمی پیچیده از انواع گونه ها و سویه های باکتری های اسید لاکتیک است. این تنوع میکروبی جداسازی مستقیم باکتری پروبیوتیک از این محصولات را با مشکل مواجه ساخته است؛ به طوری که اغلب برای بررسی ویژگی های پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک از باکتری های ذخیره شده در کلکسیون میکروبی استفاده می گردد(۷). در واقع بررسی بقای سویه ها در سیستم گوارش از مهم ترین فاکتورهاست که مقاومت در برابر اسید و صفرا دو خصوصیت اساسی برای عبور از دستگاه گوارش است، از این رو اولین قدم در انتخاب ارزیابی خصوصیات پروبیوتیک، این فاکتور ها در نظر گرفته می شود. کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می کند و شدت اثر بازدارندگی آن به وسیله ی غلظت نمک های صفرا تعیین می شود. در دستگاه گوارش انسان میانگین غلظت نمک های صفراوی ۰/۳٪وزنی/حجمی است و برای غربال سویه های مقاوم به صفرا بحرانی و کافی تلقی می شود. انتروکوک ها از طریق دکانژوگه نمودن اسید های صفراوی و بهبود سیستم ایمنی میزبان، اثر محافظتی خود را در مقابل سرطان ایفا می کنند (٤ و ٥ و ۸ و ۹).

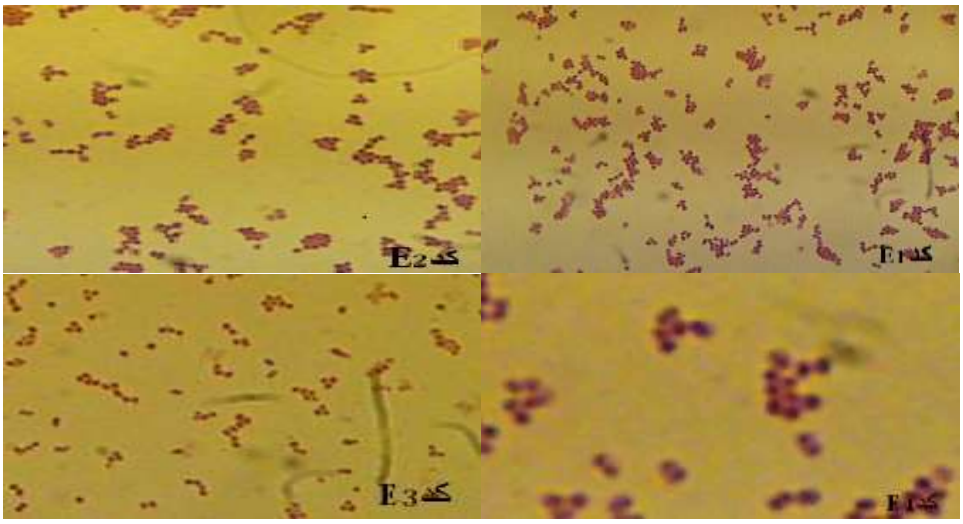
از طرفی در سال های اخیر تاثیر بازدارنده برخی از پروبیوتیک ها بر روی تعدادی از باکتری های بیماری زای مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است (۱۰). مسمومیت های باکتریایی ناشی از مواد غذایی از مشکلات رایج در جامعه انسانی هستند که بخش عمده ای از آن ها توسط انتروتوکسین های استافیلوکوکوس اورئوس ایجاد می شوند (۱۱). تیفی موریوم نیز از خطرناک ترین سروتیپ سالمونلا برای انسان است که موجب بروز گاستروانتریت می شود که این بیماری در اثر مصرف غذای آلوده ایجاد می شود و رایج ترین عفونت غذایی را به خود اختصاص داده است (۱۲). پروبیوتیک ها از جمله انتروکوک ها با تولید باکتریوسین هایی مانند: انتروسین، نایسین، H2S فعالیت ضد باکتریایی بر علیه این پاتوژن ها دارند (۱۰،۱۳).

هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی انتروکوک های برتر از کمه (فراورده لبنی سنتی سبزوار) وآنالیز خصوصیات پروبیوتیکی آن که می تواند منجر به انتخاب باکتری های پروبیوتیکی با ویژگی هایی شود که تحمل شرایط بوم شناسی محصولات لبنی را داشته باشد ونیز به عنوان ابزاری برای انتقال پروبیوتیک های برتر به دستگاه گوارش مورد استفاده قرار گیرد.

مواد وروش ها

جمع آوری و آماده سازی نمونه

در این پژوهش از چهار روستای شهرستان سبزوار (طرسک، بید، صدخرو، دارین)، تحت شرایط استریل، نمونه کمه (فراورده لبنی سنتی سبزوار) جمع آوری شد. ۱۰گرم از نمونه جهت آماده سازی، با ۹۰ سی سی محیط پپتون واتر (Merck) همگن شد، سپس برای غنی سازی، ۱۰ سی سی از محلول همگن شده به ۱۰۰ سی سی محیط کشت Broth MRS (Merck) اضافه شدو در شرایط بی هوازی و CO_2 دار که با استفاده از گاز پک مهیا و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. باید اشاره کرد که در تمامی مراحل خالص سازی از آنتی بیوتیک نیستاتین برای کاهش مخمر استفاده شد.



تصویر۱- تصاویرمیکروسکوپی ٤ سویه مشکوک به انتروکوک

جداسازی باکتری های هتروتروف

برای جداسازی باکتری های هتروتروف ،۱ گرم ازنمونه لبنی مورد نظر تحت شرایط استریل به لوله ای حاوی ۹ میلی لیتر بافرفسفات سالین PBS افزوده و رقت سازی تا غلظت $۱۰^{-٦}$ انجام گردید و پس از آن از سه رقت آخر به طور جداگانه به محیط پلیت کانت آگار استریل مذاب اضافه و کشت پور پلیت انجام و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرم خانه گذاری شد و با استفاده از رابطه زیر تعداد باکتری ها محاسبه گردید.

میانگین تعداد کلنی در ۳ پلیت×عکس ضریب رقت×۱۰ =$Cfu\ ml^{-1}$

غربال انتخابی سویه های مقاوم به اسید

محیط کشت بعد از ٢٤ ساعت غنی سازی، در دو فالکون استریل ۵۰ سی سی، به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی دور ریخته و رسوب با بافرنمک فسفات اسیدی pH=4.5 به مقدار ۲۰ میلی لیتر، به مدت ۲ ساعت تحت شرایط بی هوازی و Co_2 انکوبه شد.سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه و در دور۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با بافر خنثی مجدداً سانتریفیوژ شد و در پایان ۵ میلی لیتر باقی مانده به آرامی با رسوب مخلوط شد. سوسپانسیون باقی مانده در محیط (KAA Agar(Merck، کشت سفره ای و به مدت ۷۲ ساعت،در دمای ۳۷ درجه و شرایط بی هوازی و CO_2 قرار داده شد. از کلنی های حاصل ۳-۵ بار کشت خطی داده شد و برای تایید جنس باکتری ها، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز، رشد در pH=۹/٦ رشد در ٦.۵٪ نمک سدیم کلرید، رشد در دمای ۱۵ و٤۵ درجه سانتیگراد انجام شد. در پایان کلنی های به دست آمده در ۲۵٪ گلیسرول ذخیره سازی شد.

بررسی تحمل اسیدیته و نمک صفرای باکتری ها

جهت سنجش تحمل اسیدیته باکتری های جدا شده از نمونه، از MRS Broth غنی شده‌ی ٢٤ ساعته استفاده شد وتا $۱۰^{-۵}$رقت سازی در بافر PBS درPH=7 انجام شد و از دو رقت آخر کشت سفره ای انجام شد. در مرحله دیگر ۱ سی سی از براث غنی شده، داخل ۲۰ سی سی بافر pH=4 به مدت ۲ ساعت تحت شرایط بی هوازی وCo_2 انکوبه شد و پس از زمان سپری شده رقت سازی تا $۱۰^{-۵}$ انجام و از دو رقت آخر کشت صورت گرفت.

از کشت سویه های غربالگری شده اسیدی به محیط MRS Broth بدون نمک صفراوی و نیز محیط براث همراه نمک صفراوی ۰.۳Oxgall٪ تلقیح داده شد و جذب نوری آن در ٦۰۰ نانومتر در بازه های زمانی صفر،۸،۱٦،٢٤ خوانده شد. در پایان این مرحله نیز تست تخمیر قند گلوکز وهیدرولیز آرژنین انجام شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی

در این تست، سویه های پاتوژن سالمونلا تیفی

موریوم ATCC14389 و استافیلوکوکوس اورئوس ATCC۱۸۹۷۳ از دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شد و پس از غنی سازی ۲٤ ساعته پروبیوتیک ها، دیسک بلانک ها در عصاره های باکتری های پروبیوتیکی به مدت یک ساعت قرار گرفتند و سپس در فور دمای ٤۰ درجه با حفظ شرایط استریل منتقل شد تا کاملا خشک شوند . سپس دیسک ها بر روی پلیت های کشت مولر هینتون آگار، که به طور جداگانه به هر دو نوع پاتوژن ، آغشته شده بودند، قرار گرفتند. در این مطالعه از دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به عنوان شاهد مثبت، و دیسک آغشته به متیل سولفاکساید به عنوان شاهد منفی آزمایش استفاده شد و قطر هاله اطراف دیسک بعد از ۲٤ ساعت با خط کش میلی متری اندازه گیری گردید.

شناسایی مولکولی پروبیوتیک ها

در این آزمایش برای شناسایی پروبیوتیک ها از روش مولکولی PCR استفاده شد.بدین منظور ابتدا DNA باکتری ها از کشت ۲٤ ساعته براث باکتری، و با استفاده از روش شیمیایی فنل-کلروفورم استخراج شد. سپس برای تعیین غلظت DNA استخراج شده ، جذب نوری در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه گیری شد و طبق فرمول زیر غلظت محاسبه شد(۱٤).

مقدار DNA بر حسب میلی گرم در میلی لیتر=

OD_{260}×عکس رقت×۵۰/۱۰۰۰

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق (Uni 1492_R ٥′TACGYTACCTTGTTACGACTT-۳′ و Bac27_F 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-۳′) با سفارش شرکت سیناژن تهیه شد، یک جفت پرایمر بر اساس جدول ۱برای شناسایی ژن 16sRNA به کار گرفته شد. دربرنامه PCR دمای دناتوراسیون ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و تعداد سیکل ها ۳۵ ، در نظر گرفته شد.

محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ بارگذاری شد و سپس باند1400bp از ژل آگاروز استخراج و جهت تعیین توالی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی درسایت بانک ژنی NCBI بلاست شده و قرابت بالاتر از ۹۷٪ به عنوان جنس و گونه مطرح گردید.

یافته ها

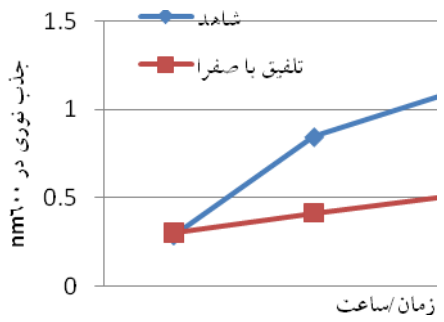
تعداد باکتری های هتروتروف نمونه ها

نتایج مربوط به شمارش باکتری های هتروتروف از فراورده لبنی(کمه)مربوط به ٤ روستای متفاوت آب و هوایی بدین صورت بود که روستای طرسک، کدA با تعداد $٤×۱۰^{٦}$cfu/ml، روستای بید ،کد B با تعداد $۹×۱۰^{٥}$، روستای صدخرو ،کد C با تعداد $۱×۱۰^{۷}$ و در انتها روستای دارین، کدD با تعداد $۱/۲ ×۱۰^{۷}$ بود.

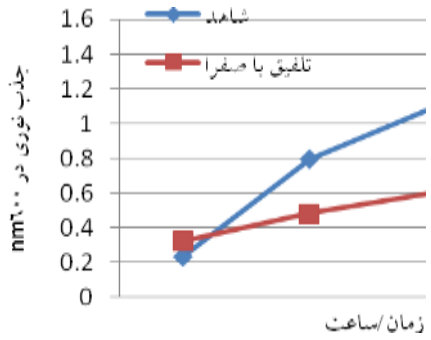
غربال انتخابی انتروکوک های مقاوم به اسید

شرایط اسیدی اعمال شده برای غربالگری انتروکوک ها pH=4 /5 در نظر گرفته شده بود که در این بین ٤ سویه باکتری مشکوک به انتروکوکوک با ویژگی های ظاهری متفاوت در محیط KAA Agar بعد از انجام کشت خطی متعدد برای خالص سازی، ظاهر شدند.

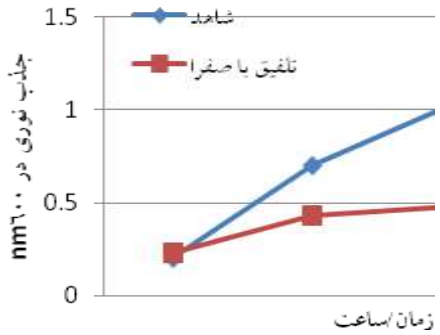
برای هر کدام از باکتری های رشد کرده در محیط افتراقی، تست ها جداگانه انجام شد. در ابتدا رنگ آمیزی گرم برای سویه ها انجام که نتایج نشان دهنده ی این بود تمامی گونه‌ها بنفش رنگ ودر نتیجه گرم مثبت بودند (تصویر۱). تست کاتالاز تمامی سویه ها نیز منفی بود. تست بعدی انجام شده ، رشد در دمای ٤۵ درجه و ۱۵درجه سانتیگراد بود که تمامی سویه ها قادر به رشد در این دو دما بودند (ویژگی انتروکوک ها).در تست رشد در pH=9/6 تمامی ٤ سویه قادر بودند این شرایط بازی را تحمل ورشد نمایند. ٤ سویه مشکوک به انتروکوک ها، قادر به تجزیه قند گلوکز بودند و رنگ محیط را از آبی نفتی به سمت سبز کم رنگ سوق دادند ولی قادر به تولید گاز نبودند و نیز ٤ سویه قادر به رشد در مقدار٦/۵٪ نمک



نمودار ۱: مقایسه ی شاهد کدE1 با نمونه همراه با ۰/۳٪ نمک صفرا



نمودار ۲ : مقایسه ی شاهد کدE2 با نمونه همراه با ۰/۳٪ نمک صفرا



Nacl که یکی از مشخصه های اصلی انتروکوک ها می باشد و هم چنین تمام سویه قادر به هیدرولیز آرژنین بودند.

نتایج حاصل از تحمل اسید و نمک صفراوی

با مقایسه تعداد کلنی ها قبل وبعد از تیماراسیدی مشاهده شد، بیش ترین تعداد زنده مانی مربوط به کدE2 می باشد زیرا مقدار آن از ۲۰×۱۰^{۷}cfu/ml به cfu/ml ٤×۱۰^{۷} رسیده بود و نسبت به ۲ کد دیگر کم ترین اختلاف تعداد را قبل و بعد از تیمارنشان داد . بعد از آن کد E1 وE3 در یک جایگاه قرار گرفتند، به طوری که کد E1،تعدادآن از۳٦×۱۰^{۷} قبل از تیمار به ۱۲×۱۰^{۷}بعد از تیمار اسیدی رسید و کد E3 ه تعدادش از۲٦×۱۰^{۷} قبل از تیمار به ۲×۱۰^{۷} بعداز تیمار رسید.کدE4 نیز بر اثر تیمار اسیدی از بین رفت، زیرا بعد از تیمار اسیدی هیچ کلنی مشاهده نشد و به همین دلیل این کد حذف شد.

تحمل ۳ سویه متفاوت پروبیوتیکی نسبت به نمک صفراوی ۰.۳٪،بر اساس جذب نوری در ٦۰۰ نانومترو در بازه های زمانی (صفر،۸،۱٦،۲٤) به صورت جداگانه

جدول۱: میزان مهار کنندگی سویه های جداسازی شده در مهار باکتری های بیماری زا بر حسب میلی متر

باکتری پروبیوتیکی	قطر هاله عدم رشد روی استافیلوکوک به میلی متر	قطر هاله عدم رشد روی سالمونلا به میلی متر
کدE1	۲۳/٤±۱/۲	۱۶.۷±۱/۳
کدE۲	۱۲/۳±۱/۱	۵±۱/۳
کدE3	۱۵/۷±۱/۳	۷±۱/۳

سنجیده شد (نمودار های ۱، ۲ و۳). با توجه به نمودار ها، کد E2 بیشترین میزان زنده مانی را نشان داد به طوری که جذب نوری آن از ۱/٤۰۵ به ۰/۷۲۱ رسیده است ورتبه نخست را دارا می باشد.

نتایج اثر ضد میکروبی پروبیوتیک ها

پس از ۳ بار تکرار هر آزمون، قطر هاله های ایجاد شده بر حسب میلی متر اندازه گیری و سپس میانگین داده ها برای هر سویه ی باکتری ثبت و با سویه های باکتری های دیگر مقایسه شدند.(جدول۱).

براساس نتایج به دست آمده در این مطالعه،۳ کد مورد نظر تاثیر معنی داری در جلوگیری از رشد استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم داشتند که به نظر می رسد این اثر مربوط به تولید مواد ضدمیکروبی در این باکتری ها باشد.

شناسایی مولکولی پروبیوتیک ها

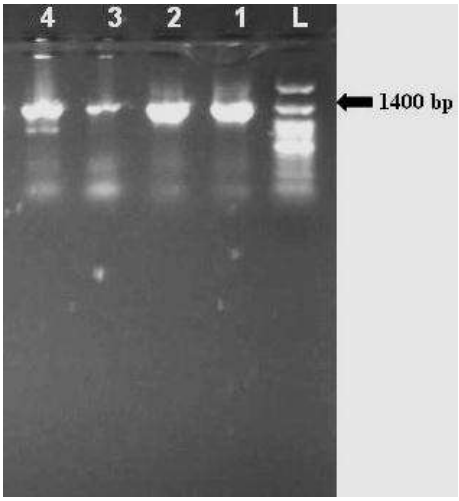
میزان DNA استخراج شده از باکتری های مولد پروبیوتیک ازنظر کیفی و کمی با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و بار گذاری در ژل بررسی شد و نتایج حاصله نشان داد که از کمیت مناسبی برخورداربودند. شناسایی مولکولی باکتری های مولد پروبیوتیک با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 16S rDNA با پرایمرهای ویژه این ژن (27F, 1492R) انجام شد. سپس محصول ۱٤۰۰ bp حاصل از PCR از ژل استخراج، خالص سازی و تعیین توالی شد(تصویر۲). توالی حاصله در بانک های ژنی ، بلاست شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸٪) به عنوان جنس و گونه باکتری تعیین گردید.

چاهک (L): DNA مارکر ۱۰۰ bp، چاهک (۱): سویهE1 چاهک (۲): سویه E2 ، چاهک (۳): سویه E3 ، چاهک (٤): کنترل مثبت (E. coli PTCC 12456)

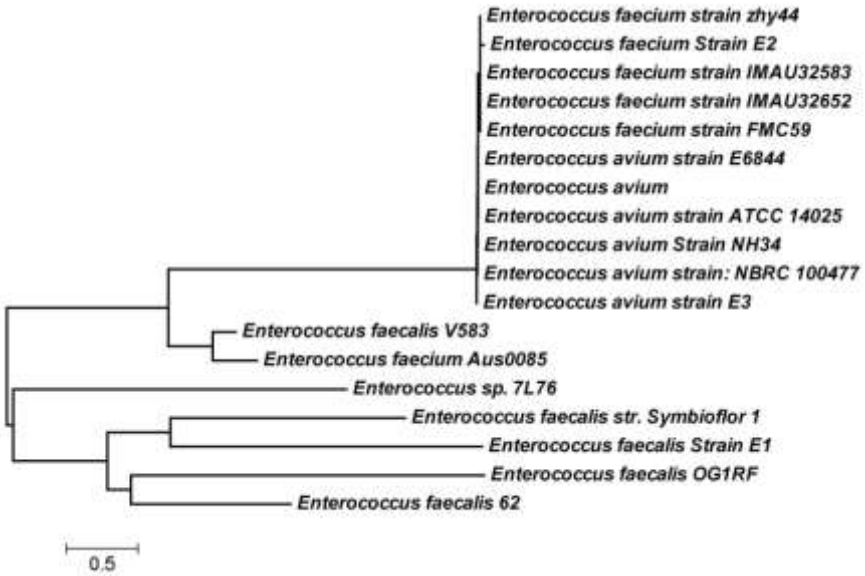
داده های حاصل از تعیین توالی به وسیله نرم افزار بلاست مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت و نتایج مشخص کرد که سویه E1 بالاترین همسانی (۹۹ درصد)، با جنس و گونه Enterococcus faecalis را داشت و سویه E2 بالاترین همسانی (۹۹درصد)، با جنس و گونه Enterococcus faecium و در نهایت سویه E3 ،با جنس و گونه Enterococcus avium تطابق داشت. توالی‌های حاصل از سویه‌های جداسازی شده، همراه با توالی سویه استاندارد در نرم‌افزار MEGA-4 وارد گردید، قرا بت و نزدیکی سویه‌ها به صورت درخت فیلوژنی با روش Cluster W به دست آمد (تصویر۳).

بحث

رفتارهای فیزیولوژیکی برای حفظ بقاء باکتری های موجود در دستگاه گوارش، شامل مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک های صفراوی می باشد(۱۵). در این پژوهش، برای جداسازی باکتری های مقاوم به اسید، از محیط معدنی PBS با PH=٤/۵ به مدت ۲ساعت استفاده شد که بسیاری ازباکتری های حساس به اسید از بین رفتند در واقع روش غربالگری اسیدی با توجه به بار میکروبی بالا در محصولات لبنی سنتی، می تواند روش مناسبی برای جداسازی و شناسایی باکتری های با پتانسیل پروبیوتیکی باشد و نیاز برای جداسازی مقدماتی و زمان بر جمعیت باکتریایی اولیه را برطرف می سازد. در این بررسی ۳ گونه متفاوت انتروکوک باکتری پروبیوتیک از جمله آویوم، فکالیس و فاسیوم وجود داشت. در کشورهایی نظیر آلمان، فرانسه، استرالیا انواع مختلف



تصویر۲: تصویر ژل الکتروفورز تکثیر ژن 16S rDNA جهت شناسایی مولکولی باکتری ها



تصویر۳: دندوگرام مربوط به تحلیل آماری مربوط به ایزوله های جداسازی شده در مطالعه

محصولات پروبیوتیک تولید می شود در حالی که در کشور ما هنوز تولید کنندگان مواد غذایی و لبنیاتی شناختی کامل از پروبیوتیک ها ندارند(۱۵).

لطفی و همکارانش در سال ۱۳۸۹جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس فکالیس را با کمک PCR انجام دادند(۱٦). در بررسی ما هم نیز همین پروبیوتیک ها با این روش ذکر شده جدا و شناسایی شدند ولی محصول لبنی ما متفاوت بود. Javed و سایرین در سال ۲۰۱۰، با استفاده از PCR انتروکوکوس فاسیوم را جدا و با روش Agar spot نشان دادند که فعالیت ضد میکروبی در حدود ۱۳ میلیمتر بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس داشته است (۱۷). در بررسی ما نیز با روش Blank disk به همین نتیجه دست یافتیم.

جعفری و همکارانش درسال۱۳۹۱ از محصولات لبنی تخمیری سنتی شهرستان مغان جداسازی انتروکوکوس فاسیوم، انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس اویوم را انجام دادند که ابتدا باکمک تست های بیوشیمیایی این گونه ها را شناسایی کردند و دریافتند که 26ایزوله درمقابل PH=2/5 پایدار بودند و ۱۰ ایزوله در مقابل غلظت ۰/۳٪ نمک صفراوی مقاوم بودند ونیز با روش چاهک خاصیت ضد میکروبی سویه ها را بر علیه

لیستریا انتروکولیتیکا و اشرشیا کلی سنجیدند(۱۵). در بررسی مانیز همین باکتری ها با این نتایج جداشدند ولی مقدار pH مورد نظر و پاتوژن ها متفاوت بودند وشناسایی شان بر پایه تکنیک PCR بود.

Rives و همکارانش در سال ۲۰۱۱، 27 گونه انتروکوک از شیر و پنیر جدا کردند که ۲۲گونه انتروکوک فاسیوم و ۵ سویه انتروکوک فکالیس و تست های شناسایی از قبیل رشد در دمای ٤٥ و ۱۰ درجه سانتی گراد،٦/٥٪Nacl،pH=9/6 برای تایید بر شناسایی این سویه ها انجام شد. ممانعت کنندگی سویه های TW15،TW20، TW22بر روی استافیلوکوکوس اورئوس حدود ۱۱/۵تا ۱۳ را نشان دادند(۱۸). بررسی ما هم نیز به همین صورت انجام شد و به همین نتایج رسیدیم.

Monteagudo-mera و همکارش در سال ۲۰۱۱، ثبات کردند که لاکتوکوکوس لاکتیس و انتروکوکوس فکالیس جدا شده بر روی استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا با استفاده از روش Agar spot ممانعت کنندگی معنی داری دارد(۱۹). در بررسی ما نیز این پروبیوتیک ها البته فقط بروی پاتوژن اولی، که صورت گرفت مطابق همین پژوهش اثر بازدارنگی وجود داشت ولی روش مورد استفاده ما متفاوت از این روش بود.

Harun al-Rashid در سال۲۰۰۷، Lavanya (۲۰۱۱)، Abdi و همکارانش (۲۰۰٦)،باکتری های لاکتوکوکوس لاکتیس، انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از فراورده لبنی سنتی را نشان دادند که قادرند غلظت ۰/۳٪ صفرا و فقط اسیدیته مقدارpH=٤ را تحمل کنند و اسیدیته بیش تر از این مقدار را نمی توانند تحمل کنند (۲۰،۲۱،۲۲). نتایج به دست آمده در رابطه با پروبیوتیک های جداسازی شده از محصولات لبنی مورد استفاده در این پژوهش یکسان است.

هر چند در این بررسی تعداد معدودی باکتری دارای پتانسیل پروبیوتیک به دست آمد ولی با شناسایی و شناخت آن ها می توانیم قدم های موثری در توسعه و بهره برداری از آن ها برداریم.

نتیجه گیری

بر اساس یافته های این بررسی می توان ذکر کرد که محصول لبنی مناطق مذکور، منابع با ارزشی جهت جداسازی باکتری های پروبیوتیک هستند. سویه های جداسازی شده از این محصول سنتی مقاومت بهتری نسبت به شرایط اسیدی و نمک صفراوی نشان دادند واثر آنتاگونیستی خوبی بر روی پاتوژن های مورد نظر داشتند که مربوط به باکتریوسین می باشد ولی باید مورد بررسی قرار گیرد و نیز پیشنهاد می شود با همکاری کارخانجات لبنی این سویه های پروبیوتیک به طور انبوه در محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله بر خود لازم میدانیم که از همکاری واحد علوم تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی سیرجان- دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار و نیز دانشگاه باهنر کرمان که در اجرای این پژوهش ما را یاری نمودند کمال تشکر و سپاسگزاری را داشته باشیم.

References

1. Gupta V, Garg R. Probiotics. Indian J Med Microbiol.2009; 27(3): 202-9.
2. Baruzzi F, Poltronieri P,Marina Quero G , Morea M , Morelli L.An in vitro protocol for direct isolation of potential probiotic lactobacilli from raw bovine milk and traditional fermented milks. Appl Microbiol Biotechnol.2011;90(1):331–42.
3. Songisepp E, Kullisaar T, Hutt P, Elias P, Brilene T, Zilmer M, Mikelsaar M. A New Probiotic Cheese with Antioxidative and Antimicrobial Activity. J Dairy Sci.2004; 87(7):2017–23.
4. Fisher K, Phillips C .The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology.2009; 155 (6): 1749–57.

5. Cebrián R, Baños A,Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of Enterococcus faecalis UGRA10, a new AS-48-producer strain. Food Microbiol.2012; 30(1) :59-67.
6. Both E, György E, Z. Kibédi-szabó C, Tamás E, Ábrahám B, Miklóssy I, Lányi S. Acid and bile tolerance, adhesion to epithelial cells of probiotic microorganisms. U.P.B. Sci Bull, Series B.2010; 72(2):37-44.
7. Olfat s, Barakat, Ibrahim GA, Tawfik NF, El-Kholy WI, Gad el-rab DA . Identification and probiotic characteristics of Lactobacillus strains isolated from traditional domiati cheese. Inte J Microbiol Res.2011;3(1): 59-66.
8. Bhardwaj A, Gupta H, Kapila S, Kaur G, Vij Sh, Kumar Malik R. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic Enterococcus faecium KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. Inte J Food Microbiol.2010;141(3) :156–64.
9. Renye JA Jr, Somkuti GA, Paul M , Van Hekken DL. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by Enterococcus faecium and Enterococcus durans isolatfrom Hispanic-style cheeses. J Indian Microbiol Biotechnol.2009;36(2):261–8.
10. Wysong C. Rationale For Probiotic Supplementation.Wysong Corporation.2006;1-9.
11. Charlier C, Cretenet M, Even S, Le Loir Y. Interactions between Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. Inte J Food Microbiol. 2009;131(1):30–9.
12. Monadi A.R, Mirzaei H , Javadi A , Hosseinzade N,Amjadi Y . Effect of some probiotics on Salmonella typhi during associated growth in milk. African J Microbiol Res.2010;3(24):2708-11.
13. Devriese L, Baele M، Butaye P. The Genus Enterococcus: Taxonomy. Prokaryotes .2006; 4:163–74.
14. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning III: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.2001;1115.
15. Jafari B,monadi A,Rezayi A, Alizadeh S, Ahmadizadeh CH, Pashazadeh M, Barzegar A, Jafarzadeh H. Assessment of potential probiotic Enterococci isolated from traditional dairy products(Moghan and Meshginshahr). J Veterinary Med, IAUT. 2013;6(1):1505-13. [Persian].
16. Lotfi H, Hejazi A, Maleki zanjani B, Barzegari A. Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Potentialy Probiotic Bacteria from Traditional Dairy Products from Heris and Sarab Regions. Res J Food.2010;3(1): 1-17. [Persian] .
17. Javed I, Ahmed S, Manam S, Riaz M, Ahmad B, Ali MI, Hameed A,CHaudry GJ. Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of a Bacteriocin from Newly Isolated Enterococcus faecium IJ-31. J Food Prot.2010; 73(1) :44–52.
18. Rivas FP, Castro MP, Vallejo M, Marguet E, A. Campos CA. Antibacterial potential of Enterococcus faecium strains isolated from ewes' milk and cheese. LWT - Food Sci and Tech.2012;46(2) :428-36.
19. Monteagudo-mera A, Caro I, Rodri L, Aparicio G, Ru A , Ferrero M, Garci a-armesto M. Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products. J Food Protec.2011; 74(8):1379–86.
20. Harun-ur-Rashid Md ,Togo K , Ueda M ,Miyamoto T.Probiotic Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Fermented Milk 'Dahi' in Bangladesh. Pakistan J Nut.2007; 6 (6): 647-52.
21. Lavanya B, Sowmiya S, Balaji S , Muthuvelan B. Screening and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk.British J Dairy Sci.2011; 2(1): 5-10.
22. Abdi R., Sheikh-Zeinoddin M and Soleimanian-Zad S. Identification of lactic acid bacteria from traditiona Iranian lighvan cheese, Pakestan j biological sci.2006;9 (1): 99-103.

Screening, identification and evaluation of probiotic potential of Enterococci in traditional dairy products of Sabzevar

Sara Rashid., MSc
MSc of Microbiology, Islamic Azad University, Sciences & Research, Sirjan, Iran

Mahdi Hasanshahian.,PhD
Assistant Professor, Department of Biology, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran

Mohammad Reza Saeidi-asl., PhD
Associate Professor, Department of Food Sciences & Technology, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

Hossein Estiri
Instructor, Department of Food sciences & Technology, Islamic Azad University, Sabzevar, Iran

Received:03/12/2013**, Revised:**27/01/2014**, Accepted:**01/03/2014

Corresponding Author:
Sara Rashid, Department Of Microbiology, Islamic Azad University, Sciences & Research, Sirjan, Iran.
E-mail:s.rashid@srbiau.ac.ir

Abstract

Background: Probiotics are beneficial microorganisms that will be health effects, if be used in a sufficient amount. Due to the growing use of industry dairy, rather than traditional products, there is the possibility of losing a lot of probiotic bacteria. It is, therefore, essential to identify the bacteria from traditional sources and use them in the production of dairy products. The aim of this study was to screen and identify Enterococci from KAMEH (a traditional dairy product of Sabzevar), and evaluation of their probiotic potential.

Material and Methods: In this study, sampling was carried out from four different villages. For screening, the collected samples were placed in pH 4.5. The remained strains were evaluated in pH 4 and 0.3 % bile salt. Antimicrobial activity of screened strains was analyzed against Salmonella typhimurium and staphylococcus aureus using disc plate method. Finally, the strains were identified by PCR and sequencing techniques.

Results: The results showed that three different species of Enterococci , including E. faecium, E. avium and E. faecalis, exist in KAMEH, which have a strong probiotic potential, such that they can withstand high levels of acid and bile salts . E1 code had most antimicrobial activity.

Conclusion: This study revealed that KAMEH has Enterococci with appropriate probiotic potential, and can be added as a supplement to other dairy products.

Keywords: *Staphylococcus aureus, Entrococcus, Probiotic, Salmonella typhimurium, KAMEH*