



## جداسازی، شناسایی و بررسی خواص پروپیوتیکی باکتری‌های اسید لاكتیک جدا شده از ماست‌های محلی شهرستان بناب

**مرتضی مهاجری امیری<sup>۱\*</sup>**

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

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

### چکیده

اهمیت پروپیوتیک‌ها 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 لاكتیک در جنس‌های لاکتوپاسیلوس، بیفیدوباکتریوم و استرپتوکوکوس شده است که معمولاً به عنوان پروپیوتیک شناخته می‌شوند. در این مطالعه از سه ماست محلی مریبوط به شهرستان بناب برای جداسازی پروپیوتیک‌ها استفاده شد. خواص پروپیوتیکی از جمله: مقاومت به اسید، مقاومت به نمک‌های صفراء، هیدرولیز کلسترول و املاح صفراء، خاصیت ضدمیکروبی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خودتجمعی و تجمیع مشترک مورد مطالعه قرار گرفتند و در نهایت جدایه‌های منتخب برای شناسایی مولکولی ارزیابی شدند. از این سه محصول، ۱۱ جدایه بررسی شدند، که ۷ جدایه به لاکتوپاسیلوس‌ها و ۴ جدایه به استرپتوکوک‌ها تعلق داشتند. اکثر جدایه‌ها در دو یا سه خصوصیت دارای پتانسیل پروپیوتیک بودند، ولی در این میان، ۲ جدایه نتایج بهتری در اکثر تست‌های ارزیابی پروپیوتیک‌ها نشان دادند. این جدایه‌ها با استفاده از PCR برای بررسی 16S rRNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از توالی‌یابی و بررسی توالی‌ها مشخص شد که یک جدایه به لاکتوپاسیلوس کازئی و جدایه دیگر به لاکتوپاسیلوس رامنوسوس با تشابه بیش از ۹۹ درصد تعلق دارند. این مطالعه تأیید می‌کند که محصولات لبنی سنتی منبع مهمی برای جداسازی باکتری‌های پروپیوتیک می‌باشد. بنا بر این شناسایی و بهینه‌سازی جدایه‌های بومی که در اکثر بررسی‌ها، پتانسیل پروپیوتیکی بهتری دارند می‌تواند مسیر را برای تولید مکمل‌ها و محصولات پروپیوتیک جدید، هموار کند.

**کلمات کلیدی:** باکتری پروپیوتیک، محصولات سنتی تخمیری، لاکتوپاسیلوس، استرپتوکوک، 16S rRNA

\* biotechmm2016@gmail.com

## مقدمه

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 پروپویوتیک ها استفاده شد. خصوصیات پروپویوتیکی مانند: مقاومت به اسید، مقاومت به نمک های صفراوي، هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوي، خاصیت ضد میکروبی و ویژگی های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خود تجمعی و تجمیع مشترک مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت جدایه های منتخب برای شناسایی مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## مواد و روش ها

### جمع آوری نمونه ها و جداسازی باکتری های اسید لакتیک

سه نمونه از ماست های محلی از اطراف شهر بناب جمع آوری شدند و در یک جعبه یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی و شناسایی پروپویوتیک های بالقوه و ارزیابی آنها انجام شد.

نمونه ها با استفاده از آب بیتون ۱ درصد (شرکت سیگما، آمریکا) رقیق شدند. تکنیک pour-plate با استفاده از محیط MRS Agar (شرکت مرک، آلمان) و M17 (شرکت مرك، آلمان) انجام شد و پلیت ها به صورت بی هوازی در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ h ساعت در انکوباتور گرمگذاری 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 (mL) ۵۰ سرم فیزیولوژی: ۵۰ mL گلیسرول) جدایه ها ذخیره سازی شدند. نمونه های ذخیره در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$ - نگهداری شدند. فعال سازی جدایه ها با کشت دادن آنها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  پیش از بررسی ویژگی های پروپویوتیک انجام شد.

محیط کشت رشد یافته در دور  $5000\times\text{g}$  به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد، پس از خالی کردن مایع رویی، رسوب با بافر فسفات (PBS) (pH=7)  $0.1\text{M}$  شستشو داده شد، پس از

اثربخشی پروپویوتیک ها بر سلامت انسان، موجب شده است که این میکرووار گانیسم ها به عنوان مکمل غذایی و دارویی مورد توجه پژوهشگران حوزه سلامت قرار گیرند(۱). بهبود عملکرد سیستم ایمنی، ایجاد تعادل در میکروبیتا، جلوگیری از بروز و عود بیماری های عفونی و اختلالات گوارشی، تنظیم شرایط التهابی، کاهش اثرات عدم تحمل لاكتوز و جلوگیری از سرطان کولورکتال از خصوصیات پروپویوتیک ها هستند؛ که در مطالعات متعددی بررسی شده اند(۲). همچنین؛ پروپویوتیک ها نقش ارزنده ای در درمان آلرژی و اگزما، تنظیم چربی خون و کنترل وزن دارند(۳،۴). این میکرووار گانیسم های تخمیری در روده زنده می مانند و با روش های متعددی به نفع میزان عمل می کنند. مکانیسم های اساسی عملکردی پروپویوتیک ها شامل: تقویت سد مخاطی روده، افزایش چسبندگی به سلول های روده ای، حذف رقبای پاتوژن های مختلف، ترشح ترکیبات ضد میکروبی، نقش اساسی در ایجاد محورهای روده- مغز و روده- پوست و همچنین تقویت پاسخ های ایمنی است. این اعمال با وجود مولکول های واسطه ای فعال مانند: اگرولیپی ساکاریدها، استیل کولین، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اسید ۷- آمینو بوتیریک و سروتونین انجام می گیرند(۵).

باکتری های اسید لакتیک (LAB) مانند: لاکتو بیاسیلوس، بیفیدو باکتریوم، لاکتو کوکوس و استرپتو کوکوس معمولاً به عنوان پروپویوتیک در نظر گرفته می شوند(۶). مطالعات بسیاری بر یافتن سویه های جدید پروپویوتیک و بررسی بیشتر طریقه عملکرد آنها معطوف شده است. یکی از مشهور ترین پروپویوتیک های تخمیر کننده اسید لакتیک، لاکتو بیاسیلوس ها هستند که به طور سنتی در تخمیر سبزیجات، گوشت و خصوصاً لبیات استفاده می شوند. گونه هایی از این میکرووار گانیسم ها، به همراه استرپتو کوکوس ها در محصولات تخمیری سنتی به وفور یافت می شوند(۷).

از سوسپانسیون میکروبی به میزان ۲ درصد در هر یک از محیط‌های اسید مصنوعی معده و محیط‌های کنترل محلوط شده و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرم‌ماگذاری شد. در زمان‌های صفر، یک، دو، سه، چهار و ۲۴ ساعت پس از گرم‌ماگذاری، ۱ mL از هر محیط تلقیح شده برداشته و پس از تهیه رقت‌های مناسب با راقیق کننده آب پیتونه ۱/۰ درصد به روش پورپلیت در محیط کشت M17 Agar یا MRS Broth کشت داده شد و به مدت ۴۸ h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرم‌ماگذاری شد. در نهایت تعداد میکروارگانیسم‌ها شمارش شد.

### مقاومت به نمک‌های صفراوی

میزان  $100\text{ }\mu\text{L}$  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 گرم‌ماگذاری در طول موج  $600\text{ nm}$  تا  $650\text{ nm}$  اندازه‌گیری شد. محیط‌ها به مدت ۸ h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرم‌ماگذاری شدند. جذب نوری محیط‌ها مجدداً پس از پایان گرم‌ماگذاری در طول موج  $600\text{ nm}$  تا  $650\text{ nm}$  اندازه‌گیری شد. میزان مقاومت میکروارگانیسم نسبت به صفرا از فرمول زیر محاسبه گردید:

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

که در آن  $\text{Cinh}$  ضریب بازدارندگی،  $T_8$  Control جذب نوری در محیط کشت بدون صفرا پس از ۸ ساعت گرم‌ماگذاری،  $T_0$  Control جذب نوری در محیط کشت بدون بایل قبل از گرم‌ماگذاری و  $T_8$  Treatment جذب نوری در محیط کشت حاوی صفرا پس از ۸ h گرم‌ماگذاری و  $T_0$  Treatment جذب نوری در محیط کشت حاوی صفرا قبل از گرم‌ماگذاری است. ضریب بازدارندگی ( $\text{Cinh}$ ) باید مساوی یا کمتر از ۰/۴ باشد.

### فعالیت هیدرولیز کلسترول و نمک‌های صفراوی

برای تعیین فعالیت هیدرولیز کلسترول و نمک‌های صفراوی، اسیدهای آمینه آزاد شده از نمک‌های صفراوی مزدوج شامل:  $6.0\text{ mmol/L}$  گلیکوکولات سدیم،  $6.0\text{ mmol/L}$

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

### بررسی‌های بیوشیمیایی

جدایه‌ها جهت رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز بررسی شدند و در غلظتهاي  $6$  و  $6.5$  درصد کلریدسدیم در محیط کشت M17 Broth و MRS Broth در دماهای  $34^{\circ}\text{C}$ ،  $37^{\circ}\text{C}$  و  $54^{\circ}\text{C}$  کشت داده شدند (۸).

جدایه‌ها جهت تخمیر کربوهیدرات‌ها طبق روش هاریگان و مک‌کانس بررسی گردیدند (۹). محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوگز و عصاره گوشت و با افروden فل قرمز تهیه گردید. همه قندها شامل: گلوکز، فروکتوز، گالاكتوز، لاکتوز، اینوزیتول، ترhaloz، رامنوز، ریبوz، زایلوز، ساکارز و سلوبیوز به صورت محلول استوک ۴ درصد تهیه و به وسیله یک فیلتر غشایی  $0.45\text{ }\mu\text{m}$  استریل شدند. سپس  $4.5\text{ mL}$  از محلول قندهای استریل به  $4.5\text{ mL}$  محیط کشت پایه افروده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۲۴ h کشت داده شدند و  $50\text{ }\mu\text{L}$  از کشت فعال به محیط دارای قندهای اختصاصی تلقیح و مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های دیر رشد تا ۷ روز برای بررسی در  $37^{\circ}\text{C}$  نگاه داشته شدند (۹).

### روش آزمون مقاومت به اسید

میزان  $100\text{ }\mu\text{L}$  از سوسپانسیون میکروبی را در تعداد مناسب لوشهای حاوی  $10\text{ mL}$  محیط کشت مایع مناسب با پایه MRS Broth که اسیدیته آنها بوسیله اسید کلریدریک در دو  $37^{\circ}\text{C}$  و  $4^{\circ}\text{C}$  تنظیم شده بود کشت داده شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرم‌ماگذاری شد. پس از گذشت  $3\text{ h}$  و  $4\text{ h}$  از گرم‌ماگذاری در  $37^{\circ}\text{C}$ ، از محیط‌های کشت مایع ذکر شده،  $1\text{ mL}$  برداشته و در محیط کشت MRS Agar تلقیح شد و به مدت ۴۸ h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  قرار داده شد. سپس طبق روش pour-plate تعداد میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند.

### مقاومت به شیره معده (پیسین، توپیسین)

برای تعیین توانایی چسبندگی، سلول های Caco-2 بر روی پلیت کشت بافت ۲۴ خانه با غلظت  $10^5$  سلول در چاهک کشت داده شدند و در دمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت ۲۴ h در اتمسفر ۵ درصد  $\text{CO}_2$  گرمگذاری شدند. سلول های جدا شده از کشت های ۲۴ h دو بار با بافر فسفات سالین شستشو شدند و سپس در محیط کشت DMEM High Glucose (شرکت ایده زیست نوتروکیب، ایران) بدون مکمل با غلظت  $10^7 \text{ CFU/mL}$  تا  $10^8$  مجدداً تلقیح شدند. سوسپانسیون های باکتریایی به سلول های تک لایه Caco-2 اضافه شدند. پس از ۲ h گرمگذاری در دمای  $37^\circ\text{C}$  در اتمسفر ۵ درصد  $\text{CO}_2$  چاهک ها سه بار با PBS شسته شدند تا سوسپانسیون های باکتریایی و سلول های غیر چسبنده حذف شوند و سپس با ۱ درصد Triton X-100 (سیگما آلدريج، 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 سلول های Caco-2، جدایه های فعال شده سانتریفیوژ و دو بار با استفاده از نمک فسفات بافر شسته شدند و خاصیت چسبندگی بر اساس روش Alameri و همکاران (۲۰۲۲) اندازه گیری شد (۱۱) و بر اساس معادله زیر به صورت درصد محاسبه شد:

$$\text{Adhesin ability}(\%) = \left( \frac{\text{At}}{\text{A}_0} \right) \times 100$$

که در آن "At" شماره سلول (log CFU/mL) پس از انکوباسیون و "A<sub>0</sub>" شماره سلول اولیه (log CFU/mL) است.

### تجمیع مشترک (Co-aggregation)

تجمیع مشترک یا همان باشتگی جدایه ها با استفاده از سه پاتوژن (اشریشیا کلی ATCC13706، استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1826 و لیستریا مونوستیوژنر 1299) انجام شد (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ایران). بدین منظور نمونه مورد بررسی به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  در محیط MRS Broth کشت بی هوایی داده شد به طور همزمان، کشت ۲۴ h ساعته از گونه های پاتوژن

سدیم تائورو کولات یا مخلوط نمک صفوایی مزدوج حاوی ۶۰ mmol/L اسید گلیکوکولیک، اسید گلیکوشنودوکسی کولیک، اسید تائورو کولیک و اسید تائورو دئوكسی کولیک با استفاده از نین هیدرین در جذب ۵۷۰ nm شناسایی شدند.

### آزمون خود تجمعی (Auto-aggregation)

آزمون خود تجمعی (auto aggregation) کشت های فعال بر اساس روش Gao و همکاران (۲۰۲۱) (۱۰) انجام شد و جذب در فواصل زمانی ۰، ۴ و ۲۴ ساعت ثبت شد. همچنین اتصال باکتری ها به هم با استفاده از رنگ آمیزی گرم و به وسیله میکروسکوپ نوری بررسی شد. درصد خود تجمعی بر اساس معادله زیر تخمین زده شد:

$$\text{Auto-aggregation}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{At}}{\text{A}_0} \right) \times 100$$

که در آن "At" جذب در زمان "t" و "A<sub>0</sub>" جذب در زمان ۰ است.

### اندازه گیری میزان آبگریزی

میزان آبگریزی میکروار گانیسم مورد نظر با استفاده از روش hexadecane Ayyash و همکاران (۲۰۱۸) (۷)، با استفاده از octane (مرک، آلمان) انجام شد. محیط کشت مایع MRS Broth ۲۴ در دور ۵۰۰۰×g و به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد. رسوب به وسیله بافر فسفات پتابسیم شستشو و پس از اتحلال مجدد در ۵ mL از همین بافر، جذب نوری آن در ۶۰۰ nm 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 ۶۰۰ nm اندازه گیری شد. در نهایت درصد آبگریزی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Hydrophobicity}(\%) = \left( \frac{\text{A} - \text{A}_0}{\text{A}} \right) \times 100$$

که در آن، A جذب نوری در ۶۰۰ nm و A<sub>0</sub> جذب نهایی است.

### چسبندگی به سلول های اپیتلیال روده ای رده Caco-2

میکروارگانیسم لاکتیک بر روی پلیت‌های رشد کرده هر پلیت با مخلوط حجم mL ۱۰ محیط Mueller Hinton Agar (مرک، آلمان) و لیکن ۱۰۰ از هر h باکتری پاتوژن پوشیده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ h تا ۴۸ به صورت هوایی در دمای ۳۷ °C گرمگذاری شدند. مناطق بازدارنده ایجاد شده در اطراف چاهک‌های حاوی جدایه‌های پروبیوتیک اندازه‌گیری شد و نتایج به شرح زیر تفسیر شد: مناطق بیش از ۲۰ mm نشان‌دهنده فعالیت بازدارنده‌گی قوی، مناطق ۱۰ mm تا ۲۰ پتانسیل بازدارنده‌گی متوسط و مناطق کمتر از ۱۰ mm نشان‌دهنده فعالیت بازدارنده‌گی کم بودند.

### شناسایی مولکولی پروبیوتیک‌ها

جدایه‌های انتخاب شده که از آزمون‌های قبلی بهترین نتایج را گرفتند برای شناسایی مولکولی ژن rRNA 16S 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 rRNA 16S برای شناسایی لاکتوپاسیلوس‌ها (۱۳)

(۱۳)	نوع پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه	منبع
		۵'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-	bp	
F		3'-TACGGYTACCT	۱۵۰	
R		TGTTACGACTT-3'		

شرط واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR شامل: دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ °C به مدت زمان ۵ min ۵ سیکل شامل ۱ 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 پلیمرازاسیون نهایی به مدت ۱۵ min در دمای ۷۲ °C انجام گرفت. در الکتروفورز باند به اندازه bp ۱۵۰۰ محصول PCR مشخص کننده لاکتوپاسیلوس‌ها است. باندهای تخلیص شده جهت توالی‌یابی به شرکت زیست

ذکر شده آماده شد. نمونه‌های مورد آزمایش و گونه‌های بیماری زا به مدت ۵ min دقیقه با دور ۱۰۰ 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 گرمگذاری 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:

$$\text{Co-aggregation}(\%) = \left(1 - \frac{\text{At}}{\text{A}_0}\right) \times 100$$

که در آن "At" جذب در زمان "t" و "A<sub>0</sub>" 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. سویه‌های پاتوژن مورد بررسی شامل: اشريشيا كلكي ATCC 13706، استافيلوكوكوس اورئوس PTCC1826، ليستريا مونوسيتيثرنر PTCC1299، انتروكوكوس فکاليس ATCC33186، سودوموناس آنثروينوزا PTCC1690 و سالمونلا پارا تيفي ATCC 9150 بودند (مرکز ملی ذخایر ژنتيكي و زيستي ايران، ايران). با استفاده از روش چاهک گذاري اين خاصيت مورد ارزیابي قرار گرفت. دو میکرولیتر از كشت ۲۴ h جدایه کاندید پروبیوتیک به صورت يك چاهک روی سطح پلیت MRS Agar تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق خشک شدند و سپس به مدت h ۲۴ تا ۴۸ در دمای ۳۷ °C گرمگذاری شدند. از طرف ديگر هر باکتری پاتوژن با استفاده كشت شبانه در ۳۷ °C Nutrient Broth (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ °C كشت داده شد و با استفاده از نيم مك فارلند به میزان CFU/mL ۱۰<sup>۶</sup> استاندارد شد. پس از رشد

جدول ۲: نام جدایه های بدست آمده از هر سه نوع ماست محلی و تعیین جنس میکرووارگانیسم ها

نام	نامگذاری جدایه	تعیین جنس جدایه	استرپتوفکوک	لاکتوپلیاسیلوس
نمونه	ها	جهات	Y1D	Y1A, Y1B,
Y1C	Y1A, Y1B, Y1D	Y1A, Y1B, Y1C, Y1D		
Y2C	Y2A, Y2B,	Y2A, Y2B, Y2C		Y2A, Y2B,
Y3A	Y3B, Y3C, Y3D	Y3A, Y3B, Y3C, Y3D		Y3B, Y3C, Y3D

### 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 جدایه های با مقاومت بالا هر دو مربوط به لاکتوپلیاسیلوس ها بودند و از ۶ جدایه با مقاومت متوسط ۲ جدایه مربوط به استرپتوفکوک ها و ۴ جدایه جزء لاکتوپلیاسیل ها بودند. در نهایت، از جدایه های با مقاومت پایین، یک جدایه مربوط به استرپتوفکوک ها و دو جدایه از لاکتوپلیاسیل ها بودند. نتایج در جدول ۳ نشان داده شده است.

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

### تحلیل آماری

تمام آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد. برای بررسی اینکه آیا تغییرات بین جدایه های LAB تأثیر قابل توجهی بر پارامتر های کمی داشته است، آنالیز واریانس یک طرفه انجام گردید. همچنین آزمون Tukey برای بررسی تفاوت های بین مقادیر میانگین در  $p < 0.05$  انجام شد. تجزیه و تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 22 انجام شد و تفاوت های  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شدند.

### نتایج

از سه نمونه محصول ماست سنتی شهرستان بناب، در کل ۱۱ نوع کلندی باکتری های لاکتیک جداسازی گردید. نتایج بررسی مورفولوژیک و تست های بیوشیمیایی نشان داد که ۷ کلندی به لاکتوپلیاسیلوس ها و ۴ کلندی به استرپتوفکوک ها تعلق دارند (جدول ۲).

جدول ۳: بررسی تست مقاومت به اسید در جدایه های بدست آمده از سه محصول لبنی مورد بررسی، تلقیح اولیه شاهد CFU  $\times 10^4$

کانت میکرووارگانیسم ها بعد از تیمار با اسید(CFU/mL)				نام جدایه
pH=۲.۵		pH=۴		
ساعت ۳	ساعت ۴	ساعت ۳	ساعت ۴	
$4.3 \times 10^6$	$3.2 \times 10^5$	$7.4 \times 10^7$	$9.4 \times 10^6$	Y1A
$1.5 \times 10^6$	$8.3 \times 10^5$	$3.5 \times 10^7$	$8.4 \times 10^6$	Y1B
$1.6 \times 10^6$	$3.4 \times 10^5$	$4.2 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	Y1C
$5.1 \times 10^8$	$6.5 \times 10^7$	$8.3 \times 10^8$	$7.2 \times 10^8$	Y1D
$1 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	$3.2 \times 10^6$	$2.8 \times 10^4$	Y2A
$1.3 \times 10^6$	$3.9 \times 10^5$	$5.6 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$	Y2B
$3.3 \times 10^6$	$2.7 \times 10^5$	$4.9 \times 10^6$	$1.7 \times 10^5$	Y2C
$5.6 \times 10^5$	$1.7 \times 10^4$	$2.6 \times 10^5$	$8.6 \times 10^4$	Y3A
$1.5 \times 10^5$	$3.9 \times 10^4$	$7.4 \times 10^6$	$2.8 \times 10^5$	Y3B
$1.1 \times 10^8$	$5.2 \times 10^7$	$6.3 \times 10^8$	$6 \times 10^8$	Y3C
$1 \times 10^6$	$3.8 \times 10^4$	$4.4 \times 10^4$	$1.8 \times 10^3$	Y3D

۰.۵۵	Y1A
۰.۵۲	Y1B
۰.۵۷	Y1C
۰.۳۵	Y1D
۰.۷۵	Y2A
۰.۵۹	Y2B
۰.۶۳	Y2C
۰.۶۲	Y3A
۰.۴۹	Y3B
۰.۲۷	Y3C
۰.۳۶	Y3D

### 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.

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 جدایه‌های Y3A، Y2B، Y1D و Y3C بودند. در این میان فقط جدایه‌های Y1D و Y3C بعد از ۲۴ ساعت دارای شمارش میکروبی بیش از  $10^{10}$  CFU/mL بودند و بقیه مقادیر کمتری نشان دادند.

### نتایج مقاومت به نمک‌های 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  $10^{10}$  نشان دهنده مقاومت مناسب جدایه نسبت به املاح صفراوی است. از ۱۱ جدایه مورد بررسی Y3C، Y1D و Y3D مقاومت بالا و قابل قبولی نسبت به املاح صفراوی نشان دادند که هر سه از لاکتوپاسیلوس‌ها هستند و جدایه‌های دیگر که مقاومت متوسطی نسبت به املاح صفراوی داشتند شامل: Y1B، Y1C و Y3B بودند که تنها Y1C جزء استرپتوكوک‌ها و بقیه از جنس لاکتوپاسیل‌ها هستند.

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

نام جدایه	ضریب بازدارندگی ( $C_{inh}$ ) جدایه‌ها بعد از ۸ ساعت گرمگذاری
جدول ۵: نتایج مربوط به هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی	
نام جدایه	هیدرولیز کلسترول (درصد)
Y1A	$21.1 \pm 2.05^b*$
Y1B	$12.4 \pm 1.25^d$
Y1C	$14.2 \pm 1.77^{ab}$
Y1D	$11.5 \pm 0.05^d$
Y2A	$20.6 \pm 0.59^{cd}$
Y2B	$21.4 \pm 1.54^c$
Y2C	$14.7 \pm 2.36^e$
Y3A	$8.8 \pm 3.18^f$
Y3B	$17.6 \pm 0.05^e$
Y3C	$36.2 \pm 1.13^a$
Y3D	$11.3 \pm 0.06^e$

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

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 اپیتیال مربوط به Y1B به میزان  $10^{10}$  CFU/mL و کمترین میزان آن مربوط به Y3B به میزان  $10^1$  CFU/mL بود. در این میان اکثر جدایه ها دارای چسبندگی مناسبی به سلول های اپیتیال بودند و همگی دارای مقادیر بالای باکتری (بیش از  $10^1$  CFU/mL) بودند.

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

نتایج آزمون های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول های اپیتیال روده (Caco-2) در جدول ۶ بررسی شده است. همانطور که در جدول ۶ مشاهده می شود خود تجمعی در جدایه ها پس از ساعت ۴، نهایتاً به عدد ۴.۹۱ در جدایه Y3B می رسد و کمترین میزان خود تجمعی بعد از ساعت ۴ با عدد ۱.۴۶ درصد مربوط به جدایه Y1B است. پس از ۲۴ ساعت، بیشترین میزان خود تجمعی مربوط به Y1D (۷۱.۹ درصد) و کمترین میزان مربوط به Y2A (۴۸.۷ درصد) است.

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

نام جدایه	نتایج آزمون خود تجمعی (اتواگریگاسیون)			اصاله به رده سلولی- Caco- (پس از ۲ h) لوگ (۱۰ می باشد)
	آبگریزی (درصد)	۲۴ h (درصد)	۴ h (درصد)	
Y1A	۶۳.۶ ± ۰.۵۹ <sup>c</sup>	۲۰.۳ ± ۰.۴۳ <sup>e*</sup>	۲۱.۷ ± ۱.۶۳ <sup>cd</sup>	۷.۴ ± ۰.۰۴ <sup>c</sup>
Y1B	۱.۴۶ ± ۰.۵۵ <sup>i</sup>	۱۹.۵ ± ۰.۵۵ <sup>cd</sup>	۵۶.۴ ± ۱.۲۳ <sup>f</sup>	۸.۳ ± ۰.۰۱ <sup>a</sup>
Y1C	۳.۶۴ ± ۰.۶۱ <sup>d</sup>	۴۹.۵ ± ۲.۱۱ <sup>g</sup>	۲۸.۱ ± ۱.۵ <sup>bc</sup>	۷.۷ ± ۰.۰۲ <sup>c</sup>
Y1D	۴.۰۹ ± ۰.۰۳ <sup>a</sup>	۷۱.۹ ± ۱.۴۵ <sup>a</sup>	۳۵.۵ ± ۱.۰۹ <sup>c</sup>	۷.۴ ± ۰.۰۵ <sup>c</sup>
Y2A	۲.۴۵ ± ۰.۰۷ <sup>e</sup>	۴۸.۷ ± ۲.۳۹ <sup>g</sup>	۳۲.۵ ± ۱.۸۴ <sup>b</sup>	۶۸ ± ۰.۰۱ <sup>f</sup>
Y2B	۴.۴۷ ± ۰.۲۹ <sup>f</sup>	۵۷.۳ ± ۰.۷۱ <sup>f</sup>	۲۹.۳ ± ۰.۸۳ <sup>b</sup>	۷.۹ ± ۰.۰۲ <sup>b</sup>
Y2C	۲.۴۱ ± ۰.۰۵ <sup>i</sup>	۶۰.۶ ± ۱.۳۹ <sup>c</sup>	۲۲.۴ ± ۱.۶۶ <sup>cd</sup>	۷.۶ ± ۰.۰۲ <sup>c</sup>
Y3A	۳.۰۸ ± ۰.۱۶ <sup>f</sup>	۵۳.۲ ± ۲.۰۹ <sup>c</sup>	۱۵.۷ ± ۰.۴۹ <sup>e</sup>	۷.۸ ± ۰.۰۴ <sup>b</sup>
Y3B	۴.۹۱ ± ۰.۱۳ <sup>f</sup>	۶۱.۱ ± ۰.۶۹ <sup>f</sup>	۲۱.۸ ± ۱.۶۳ <sup>d</sup>	۶.۴ ± ۰.۰۱ <sup>i</sup>
Y3C	۲.۳۳ ± ۰.۷۶ <sup>j</sup>	۵۵.۴ ± ۱.۲۳ <sup>g</sup>	۳۸.۳ ± ۲.۴۸ <sup>a</sup>	۷.۹ ± ۰.۰۲ <sup>b</sup>
Y3D	۲.۵۷ ± ۰.۰۹ <sup>i</sup>	۶۴.۴ ± ۱.۳۸ <sup>f</sup>	۲۷.۱ ± ۱.۱۷ <sup>cd</sup>	۶.۵ ± ۰.۰۱ <sup>g</sup>

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

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 جدایه های Y1B و Y3B دارای کمترین اثر تجمیع مشترک با پاتوژن ها هستند.

## نتیجه تست تجمیع مشترک (Co-aggregation) جدایه ها

جدایه ها نسبت به سه پاتوژن (اشریشیا کلی ATCC 13706، استافیلکوکوس اورئوس PTCC1826 و لیستریا مونوپیتوژنر 1299 PTCC) مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج

جدول ۷: نتایج آزمون های تجمیع مشترک با سه پاتوژن / اشریشیا کلی، استافیلکوکوس اورئوس و لیستریا مونوپیتوژنر

نام جدایه	Co-aggregation		
	اشریشیا کلی	استافیلکوکوس اورئوس	لیستریا مونوپیتوژنر
Y1A	۷.۱ ± ۰.۳۵ <sup>d</sup>	۱۲.۳ ± ۰.۶۲ <sup>b</sup>	۶.۲ ± ۰.۳۲ <sup>i*</sup>

$6.8 \pm 0.45^e$	$7.9 \pm 0.42^d$	$5.4 \pm 0.32^f$	Y1B
$9.1 \pm 0.65^d$	$14.9 \pm 0.71^b$	$10.5 \pm 0.74^c$	Y1C
$5.5 \pm 0.43^g$	$5.6 \pm 0.19^f$	$6.4 \pm 0.35^e$	Y1D
$10.6 \pm 0.61^c$	$11.7 \pm 0.55^c$	$18.8 \pm 0.45^b$	Y2A
$6.6 \pm 0.39^e$	$6.1 \pm 0.41^e$	$7.6 \pm 0.53^d$	Y2B
$8.5 \pm 0.59^d$	$10.7 \pm 0.75^c$	$9.3 \pm 0.81^c$	Y2C
$12.1 \pm 0.73^b$	$14.6 \pm 0.72^b$	$16.9 \pm 0.72^b$	Y3A
$5.7 \pm 0.27^g$	$4.3 \pm 0.34^g$	$6.1 \pm 0.16^e$	Y3B
$31.8 \pm 1.17^a$	$25.6 \pm 1.05^a$	$27.5 \pm 0.95^a$	Y3C
$9.7 \pm 0.62^c$	$11.5 \pm 0.62^{bc}$	$10.4 \pm 0.23^c$	Y3D

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

را نشان دادند. در این میان جدایه Y3C بیشترین بازدارندگی در مقابل پاتوژن‌ها را نشان داد؛ به طوری که نسبت به سودوموناس آئروژنیوزا و انتروکوکوس فکالیس قدرت بازدارندگی متوسط و نسبت به بقیه پاتوژن‌های مورد آزمون قدرت بازدارندگی قوی داشت.

### 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

جدول ۸: نتایج آزمون‌های بررسی خواص ضد میکروبی جدایه‌های اسید لاکتیک

نام جدایه	اشریشیا کلی	استافیلوکوکوس اورنوس	لیستریا منوسا-یتوژنر	انتروکوکوس فکالیس	سودوموناس آئروژنیوزا	سامونلا پارا-تیفی
$16 \pm 5^b*$	$24 \pm 6^a$	$22 \pm 2^a$	$12 \pm 2^d$	$26 \pm 4^a$	$26 \pm 4^a$	$26 \pm 4^a$
$17 \pm 2^b$	$18 \pm 2^b$	$16 \pm 4^d$	$13 \pm 2^d$	$16 \pm 4^b$	$15 \pm 5^c$	$17 \pm 2^c$
$24 \pm 6^a$	$20 \pm 5^b$	$18 \pm 2^c$	$15 \pm 1^d$	$16 \pm 4^b$	$15 \pm 3^c$	$15 \pm 5^d$
$21 \pm 4^a$	$21 \pm 4^a$	$21 \pm 5^c$	$13 \pm 2^c$	$14 \pm 2^c$	$14 \pm 2^c$	$11 \pm 1^c$
$10 \pm 5^c$	$10 \pm 5^c$	$24 \pm 2^a$	$17 \pm 4^b$	$16 \pm 6^a$	$16 \pm 6^a$	$17 \pm 4^b$
$21 \pm 4^a$	$21 \pm 4^a$	$25 \pm 3^a$	$16 \pm 4^b$	$16 \pm 4^b$	$16 \pm 4^b$	$16 \pm 4^b$
$21 \pm 4^a$	$21 \pm 4^a$	$25 \pm 3^a$	$16 \pm 4^b$	$16 \pm 4^b$	$16 \pm 4^b$	$16 \pm 4^b$
$14 \pm 3^c$	$14 \pm 3^c$	$18 \pm 4^b$	$9 \pm 2^d$	$23 \pm 7^{ab}$	$19 \pm 2^a$	$19 \pm 2^a$
$11 \pm 1^c$	$11 \pm 1^c$	$17 \pm 2^c$	$15 \pm 2^c$	$17 \pm 4^b$	$19 \pm 2^a$	$19 \pm 2^a$
$28 \pm 5^a$	$28 \pm 5^a$	$27 \pm 3^a$	$19 \pm 4^a$	$19 \pm 4^a$	$19 \pm 4^a$	$19 \pm 4^a$
$24 \pm 2^c$	$24 \pm 2^c$	$22 \pm 4^a$	$13 \pm 5^c$	$10 \pm 5^e$	$10 \pm 5^e$	$10 \pm 5^e$

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

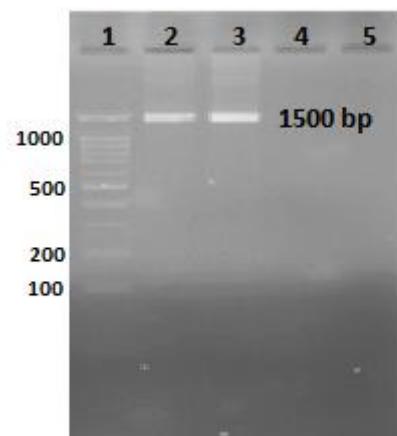
Y3C لاكتوباسیلوس کازئی با تشابه ۹۹ درصد و جدایه ۹۹ مربوط به لاكتوباسیلوس رامنوسوس با تشابه ۹۹ درصد هستند.

در میان ۱۱ جدایه مورد بررسی ۲ جدایه نتایج بهتری در اکثر تست‌های ارزیابی پروپیوتیک‌ها داشتند. این جدایه‌ها با استفاده از PCR ژن rRNA 16S مورد ارزیابی قرار گرفته و تایید شدند (شکل ۱). پس از توالی یابی و blast شدن توالی‌ها در سایت NCBI مشخص شد که جدایه Y1D، مربوط به

و بررسی های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خود تجمیعی و تجمیع مشترک است.

یکی از ملاک های بررسی پروپویوتیک ها مقاومت به اسید است(۱۵)؛ چرا که میکرووارگانیسم هایی که دارای خواص پروپویوتیکی 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 باکتری های 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 مشابه داشت(۱۸). هر چند در مطالعه حاضر، پس از تیمار سه و چهار ساعته در دو pH مختلف بین ۳ تا ۴ لوگ از مقدار تلقيق اولیه کاسته شد. این نتایج با مطالعات دیگری مثل همکاران(۲۰۱۸) 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 جدایه ها مقاومت بالایی به اسید داشتند؛ که تقریباً با نتایج این بررسی منطبق است.

ویژگی دیگری که پروپویوتیک بودن یک باکتری را نشان می دهد مقاومت به شیره گوارشی شبیه سازی شده دارای آنزیم های تریپسین و پیپسین است. در مطالعه حاضر از ۱۱ جدایه، ۴ جدایه به شیره معده (پیپسین و تریپسین) مقاومت نشان دادند. در این میان فقط دو جدایه بعد از ۲۴ ساعت تیمار با شیره معده، دارای کانت بیش از  $10^6$  CFU/mL بودند و بقیه کانت کمتر نشان دادند. در بسیاری از مطالعات انجام شده برخلاف مطالعه حاضر، دو ویژگی مقاومت به اسید و مقاومت به شیره معده ادغام شده اند و غالباً به صورت یک مطالعه جداگانه بررسی نشده اند. با این حال در مطالعات متعددی مثل Tarique و همکاران (۲۰۲۲)، Ayyash و همکاران(۲۰۱۸) و همکاران(۲۰۲۰)؛ جدایه های



شکل ۱: PCR با پرایمر عمومی (یونیورسال) لاکتوپیاسیل ها و بدست آوردن باند نهایی ۱۵۰۰ جفت باز: ۱: جفت بازی، ۲: باند مربوط به جدایه Y1D ۳: باند مربوط به جدایه Y3C، ۴ و ۵: کنترل منفی.

## بحث و نتیجه گیری

امروزه اثرات سودمند پروپویوتیک ها بر همگان آشکار شده است(۴-۲). به علت تولید باکتریوسین ها و کاہشن pH ناشی از تولید اسیدهای آلی، از این میکرووارگانیسم ها می توان برای ماندگاری مواد غذایی نیز بهره برد(۱۳). از طرف دیگر، ارتباط محصولات لبنی سنتی با سلامت انسان مذکوه است که اثبات شده است و این محصولات به عنوان منبع جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از قبیل لاکتوپیاسیل ها و استریتوکوک ها محسوب می شوند. پژوهشگران در مطالعات مختلف سعی کرده اند سویه های اسید لاکتیک با قابلیت پروپویوتیک را از این محصولات جدا کنند. با اضافه کردن این سویه ها به مواد غذایی علاوه بر تضمین سلامت انسان می توان پذیرش عمومی این مواد غذایی را نیز بالا برد(۱۴).

در این مطالعه، هدف اصلی جداسازی باکتری های لاکتیک از ماست های سنتی شهرستان بناب از استان آذربایجان و همچنین بررسی خواص پروپویوتیکی مانند: مقاومت به اسید و محیط شبیه سازی شده معده، مقاومت به نمک های صفراء، هیدرولیز کلسترول و املاح صفراء، خاصیت ضد میکروبی

که بر روی محصولات تخمیری غیر لبی 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 سلول‌های اپیتیال به میزان  $CFU/mL \times 10^{10} = 8.3$  و کمترین آن به میزان  $CFU/mL \times 10^{10} = 6.4$  گزارش شد. در کل، اکثر جدایه‌ها دارای چسبندگی مناسبی به سلول‌های اپیتیال بودند و همگی دارای مقادیر بالای باکتری (بیش از  $CFU/mL \times 10^{10}$ ) بودند. این خصوصیت در جهت پروفیوتوک بودن جدایه‌ها اهمیت بسزایی دارد و احتمال پروفیوتوک بودن آن‌ها را تأیید می‌کند. توانایی اتصال یک باکتری پروفیوتوک به سلول‌های اپیتیال 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) و Gao و همکاران (۲۰۲۰) نیز دیده می‌شود و وابستگی این خصوصیت به گونه مورد بررسی را تأیید می‌کند (۱۰، ۱۵، ۲۲).

ویژگی دیگر ارزیابی پروفیوتوک‌ها، تجمعی مشترک یا aggregation است که نشان دهنده اتصال هر جدایه به پاتوژن‌ها و ممانعت از اتصال پاتوژن‌ها به سلول‌های اپیتیال روده است. در این جدایه‌ها اثر تجمعی مشترک یا co-aggregation دارای درصدهای متفاوت هستند که در مطالعات دیگر نیز دیده می‌شود (۱۵). این مقادیر در کل، در محصولات لبی 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 پروفیوتوک 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 لاکتوپاسیلوس بیشترین

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

برای ارزیابی خصوصیات دیگر باکتری‌های پروفیوتوک، نتایج آزمون‌های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول‌های اپیتیال روده (Caco-2) مورد بررسی قرار گرفت. خود تجمعی ضامن ایجاد بیوفیلم در جدایه‌های مورب بررسی است. در این مطالعه فاکتور خود تجمعی پس از ساعت ۴، در بالاترین میزان به عدد ۴.۹۱ درصد و در کمترین 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 Alkalbani و همکاران (۲۰۲۲) و Tarique و همکاران (۲۰۱۹) مشابه است، هر چند نسبت به مطالعاتی مثل وسیعی و همکاران (۲۰۲۰) بالاتر به نظر می‌رسد (۱۵، ۲۱، ۲۲).

میزان آبگریزی نیز ضامن اتصال جدایه مورب بررسی با سلول‌های اپیتیال است. در این تحقیق، در ۱۱ جدایه مورب بررسی؛ آبگریزی در مقادیر متفاوتی مشاهده گردید، که بسته به نوع جدایه مورب بررسی بین ۱۵.۷ درصد و ۳۸.۳ درصد گزارش 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

این مطالعه تأیید می کند که محصولات لبنی سنتی منابع مهمی برای جداسازی باکتریهای پروپیوتیک می باشند. بنا بر این، شناسایی و بهینه سازی جدایه های بومی که در اکثر بررسی ها، پتانسیل پروپیوتیکی بهتری دارند می توانند مسیر را برای تولید مکمل ها و محصولات پروپیوتیک، هموار کند.

### تشکر و قدردانی

نویسنده این مقاله از پرسنل زحمت کش آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در این تحقیق نویسنده را یاری نمودند، قدردانی می نماید.

بازدارندگی در مقابل پاتوژن ها را نشان داد به طوری که نسبت به سودوموناس آئروژینوزا و انتروكوکوس فکالیس قدرت بازدارندگی متوسط و نسبت به بقیه پاتوژن های مورد آزمون قدرت بازدارندگی قوی داشت. نتایج این آزمون در هر مطالعه بسته به جدایه های مورد بررسی مقادیر متفاوتی را نشان می دهد. این تفاوت ها در مطالعات زمانی و همکاران(۲۰۱۵)، Tarique و همکاران(۲۰۲۲)، Abushelaibi و همکاران(۲۰۱۷) و Sui و همکاران(۲۰۲۱) نیز دیده می شوند(۱۵، ۱۷، ۲۳، ۲۴). هر چند 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 ویژگی های مورد بررسی نتیجه بهتری از بقیه نشان دادند با استفاده از تست های 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.

## 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. Evvie 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

- 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, Tabatabaei-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-Tarably 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.

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

**Morteza Mohajeri Amiri<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>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 the 16S 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