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

نسرین سیدقلعه[۱]، **کیوان بهشتی مآل***[۱]، رامش منجمی[۲]، علی محمد احدی[۳]

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

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

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

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

چکیده

یافتن سویه‌های جدید پروبیوتیکی می‌تواند در رسیدن به اهداف تغذیه‌ای و درمانی ناشی از مصرف آنها کمک کند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی پروبیوتیک‌ها از لبنیات سنتی شهرستان‌های اصفهان بوده است. باکتری‌های اسید لاکتیک از منابع لبنیاتی سنتی جداسازی شدند. خواص پروبیوتیکی جدایه‌ها با انجام آزمون‌های تحمل نمک‌های صفراوی، تحمل اسید و نیز بررسی فعالیت همولیتیک آنها ارزیابی شد. سپس، قابلیت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم و همچنین فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های پروبیوتیک بر علیه جدایه‌های پاتوژن *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* سنجش شد. جهت شناسایی قطعی جدایه‌ها، کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی طراحی شده در ژن 16S rRNA انجام شد و توالی‌های ژنی سویه‌ها در بانک جهانی ثبت شد. در مجموع ۳ سویه پروبیوتیک *انتروکوکوس فاسیوم* از محصولات لبنی جداسازی شدند که قادر به رشد در سطوح pH ۳ و ۴/۵ و دارای قدرت رشد در ۰/۳٪ نمک صفراوی بودند. هیچ یک از سویه‌ها قابلیت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم نداشتند. تمامی سویه‌ها، بدون اختلاف معنی دار، دارای فعالیت ضدمیکروبی بر علیه *اشریشیا کلای* و *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر هاله‌های عدم رشد ۱۲ تا ۱۶ میلی‌متری بودند. سویه‌های جداسازی شده در پایگاه داده NCBI با شماره‌های دسترسی MZ853942، MZ854204 و MZ902025 ثبت شدند. با توجه به تأیید خواص پروبیوتیکی سویه‌های بومی جداسازی شده، استفاده از آنها در تولید مکمل‌های غذایی و محصولات لبنی پروبیوتیک توصیه می‌شود.

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

* kbeheshtimaal@yahoo.com

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

مقدمه

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

باکتری‌های پروبیوتیک غالباً از غذاهای تخمیری سنتی یا از روده جدا شده‌اند. پروبیوتیک‌ها زمانی که در لبنیات و یا مکمل‌های دارویی استفاده می‌شوند، به عنوان مواد تشکیل دهنده زنده میکروبی نامیده می‌شوند (۴). این باکتری‌ها شامل گونه‌هایی از *لاکتوباسیلوس*[۲]، *بیفیدوباکتریوم*[۳]، *لئوکونوستوک*[۴]، *لاکتوکوکوس*[۵]، *انتروکوکوس*[۶]، *باکتروئیدس*[۷]، *کارنوباکتریوم*[۸]، *پدیوکوکوس*[۹]، *استرپتوکوکوس*[۱۰]، *تتراژنوکوکوس*[۱۱]، *واگوکوکوس*[۱۲]، *اوئنوکوکوس*[۱۳]، *ویسلا*[۱۴]، *باسیلوس*[۱۵]، *اوباکتریوم*[۱۶]، *فکالی-باکتریوم*[۱۷]، *اکرمانسیا*[۱۸] و *رززبوریا*[۱۹] می‌باشند که برخی از آنها به تازگی گزارش شده‌اند (۵).

محتوی اسیدی معده و خواص ضد میکروبی آنزیم‌های گوارشی مانند پپسین از ورود و بقای باکتری‌های پروبیوتیک به روده جلوگیری می‌کند. در نتیجه، بقاء در چنین شرایط بحرانی یکی از مهم‌ترین چالش‌های فیزیولوژیکی است که کشت‌های پروبیوتیک باید در هنگام تجویز خوراکی تحمل کنند. برای مقابله با این چالش، پروبیوتیک‌ها را می‌توان با سایر محصولات غذایی ترکیب کرد تا این میکروارگانیسم-هایی را قادر به زنده ماندن در طول فرآیند گوارش کند یا سویه‌های جدید پروبیوتیکی با بیشترین مقاومت در شرایط اسیدی را از منابع مختلف به دست آورد. اگرچه pH روده کوچک بین ۷ تا ۸ است و به طور قابل توجهی بقای پروبیوتیک‌ها را تهدید نمی‌کند، پانکراتین و نمک‌های صفراوی در روده کوچک می‌توانند رشد باکتری‌های پروبیوتیک را در روده مهار کنند (۶).

پروبیوتیک‌ها اثر مهاری بر رشد باکتری های بیماری زا دارند. این میکروارگانیسم‌ها اثر ضدمیکروبی خود را از طریق تولید باکتریوسین، تولید اسید لاکتیک، کاهش نفوذپذیری روده، رقابت با باکتری‌های بیماری زا از طریق چسبندگی و تحریک ایمنی مخاطی اعمال می‌کنند (۷).

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

[2] *Lactobacillus*
[3] *Bifidobacterium*
[4] *Leuconostoc*
[5] *Lactococcus*
[6] *Enterococcus*
[7] *Bacteroides*
[8] *Carnobacterium*
[9] *Pedicoccus*
[10] *Streptococcus*
[11] *Tetragenococcus*
[12] *Vagococcus*
[13] *Oenococcus*
[14] *Weisella*
[15] *Bacillus*
[16] *Eubacterium*
[17] *Faecalibacterium*
[18] *Akkermansia*
[19] *Roseburia*

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

مواد و روش ها

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

نمونه برداری از منابع لبنیاتی

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

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

پس از تهیه تعلیق باکتریایی از نمونه ماست و پنیر (انتقال جداگانه ۱۰ گرم از نمونه ماست و پنیر در ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر استریل)، ۱۰میلی لیتر از تعلیق‌های تهیه شده به صورت جداگانه به ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت MRS[20]براث انتقال یافت تا باکتری‌ها به حداکثر مقدار خود برسند و در شرایط کم هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از تهیه سری رقت از نمونه‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در محیط کشت MRS آگار کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در شرایط کم هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. جهت خالص سازی کلنی مورد نظر، کلنی‌های تک در محیط کشت MRS آگار جدید به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط کم هوازی انکوبه گردید (۸).

انجام آزمون‌های شناسایی

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

ارزیابی سویه‌ها در آزمون‌های تحمل نمک صفراوی و تحمل اسید

برای تعیین توانایی بقا در شرایط اسیدی، سویه های جدا شده در محیط های MRS با pH معادل ۱/۵ تا ۳ آزمایش شدند. در همه موارد جهت کاهش pH، از اسید کلریدیک ۸ نرمال استفاده شد و از محیط MRS با pH برابر با ۶/۴ به عنوان شاهد استفاده شد. برای تعیین توانایی بقا در شرایط نمک‌های صفراوی، این باکتری‌ها به محیط MRS حاوی ۰/۳ درصد نمک صفراوی اضافه شدند. محیط‌های کشت در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری شدند. توانایی رشد جدایه‌های مورد مطالعه در محیط‌های فوق با مشاهده تغییرات کدورت (به صورت چشمی) پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (۱۰).

بررسی فعالیت همولیتیک پروبیوتیک‌های جداسازی شده

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

بررسی فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک‌های جداسازی شده

برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتری های پروبیوتیک جدا شده از ماست و پنیر سنتی از محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش انتشار از چاهک برای تعیین اثر مهارکنندگی باکتری‌های پروبیوتیک در مقابل جدایه‌های باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* استفاده شد. باکتری‌های پاتوژن در محیط کشت مولر هینتون آگار به روش چمنی کشت داده شد و با لوله پاستورچاهک در آن ایجاد کرده و سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک به طور جداگانه در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از گذشت این زمان میانگین هاله‌های عدم رشد جدایه‌ها در مقابل سوپرناتانت باکتری های پروبیوتیک اندازه‌گیری شد (۱۰).

[20] deMan, Rogosa and Sharpe

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم پروبیوتیک‌های جداسازی شده

برای بررسی فعالیت ضدباکتریایی باکتری های پروبیوتیک جدا شده از ماست و پنیر سنتی، ابتدا از کشت‌های تازه باکتری‌ها در محیط کشت MRS سوسپانسیون‌هایی با کدورت معادل کدورت نیم مک فارلند با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ در طول موج ۶۳۰ نانومتر تهیه گردید. پس از آن، ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده در ۳ تکرار به چاهک‌های میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استریل تلقیح گردید. چاهک حاوی MRS بدون باکتری به عنوان کنترل منفی و یک چاهک حاوی جدایه‌ای از *سودوموناس ائروژینوزا* با قابلیت تشکیل بیوفیلم در محیط کشت TSB[21]، به عنوان چاهک کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس درب میکروپلیت گذاشته شد و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از طی این مدت، محلول رویی موجود در هر چاهک دور ریخته شد و هر چاهک با اضافه کردن ۳۰۰ میکرولیتر بافر فسفات نمکی سه بار شست و شو داده شد. بین هر مرحله میکروپلیت تکان داده شد تا سلول‌های پلانکتونیک جداشوند. پس از آن میکروپلیت به صورت وارونه بر روی یک دستمال کاغذی قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. پس از خشک شدن به هر یک از چاهک‌ها ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ٪۹۶ اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در مکان ثابتی قرار گرفت تا بیوفیلم‌های تشکیل شده در مجاورت اتانول تثبیت شوند. پس از آن محتوی هر چاهک تخلیه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. سپس، به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ٪۲ اضافه شد و ۱۵ دقیقه در مکان ثابتی قرار گرفت. پس از آن میکروپلیت در مسیر آب شهری کاملاً شست و شو داده شد به طوری که آب خارج شده از هر چاهک کاملاً بیرنگ باشد. در این مرحله از نظر کیفی تشکیل بیوفیلم از لحاظ شدت رنگ قابل رؤیت بود. پس از آن میکروتیتر بر روی یک سطح جاذب قرار گرفت تا کاملاً خشک شود. به منظور بررسی تولید کمی بیوفیلم ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلایسیال ٪۳۳ به هر چاهک تلقیح گردید و در دستگاه خوانش ELISA جذب نوری آن در طول موج ۴۹۲ تا۶۳۰ نانومتر قرائت گردید و نتایج با چاهک‌های کنترل منفی و کنترل مثبت مقایسه شد. در نهایت دسته بندی باکتری‌ها بر اساس جذب نوری (OD) بیوفیلم به صورت زیر محاسبه گردید (۱۳):

غیر چسبنده: $OD \leq ODc$

چسبندگی ضعیف: $ODc < OD \leq 2ODc$

چسبندگی متوسط: $2ODc < OD \leq 4ODc$

چسبندگی قوی: $4ODc < OD$ (۲۴).

(OD: میانگین جذب نوری یک باکتری و ODc: میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد)

شناسایی مولکولی با روش کلنی-PCR[22]

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

[21] Triptic soy broth

[22] Colony-Polymerase chain reaction

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

ها از دستگاه خارج شد و برای مراحل بعدی در فریزر با دمای ۲۰- °C درجه سانتیگراد نگه داری شد.

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

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

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

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

مراحل ۲ تا ۴ با ۳۰ تکرار انجام شد.

ارسال محصول حاصل از PCR جهت تعیین توالی

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

بررسی شباهت توالی با توالی‌های بانک جهانی NCBI[23] و ثبت ژن

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

نتایج

خصوصیات میکروسکوپی، ماکروسکوپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

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

[23] *National Center for Biotechnology Information*

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

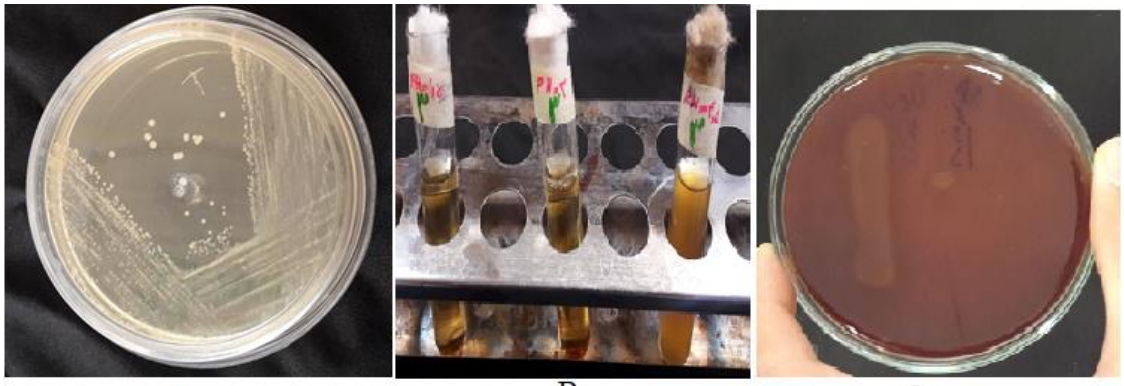
جدول ۳: ویژگی‌های جدایه‌های شناسایی شده از محصولات لبنی مورد مطالعه

منشا و محل جداسازی	نام جدایه	خصوصیات ماکروسکوپی	خصوصیات میکروسکوپی
پنیر گلپایگان	۳	کلنی‌های ریز، گرد، موکوییدی، شیری رنگ	کوکسی، گرم مثبت، فاقد اسپور
ماست گلپایگان	۸	کلنی‌های ریز، گرد، موکوییدی، شیری رنگ	کوکسی، گرم مثبت، فاقد اسپور
پنیر فریدن	۱۳	کلنی‌های ریز، گرد، موکوییدی ، شیری رنگ	کوکسی، گرم مثبت، فاقد اسپور

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

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

+ رشد، – عدم رشد



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

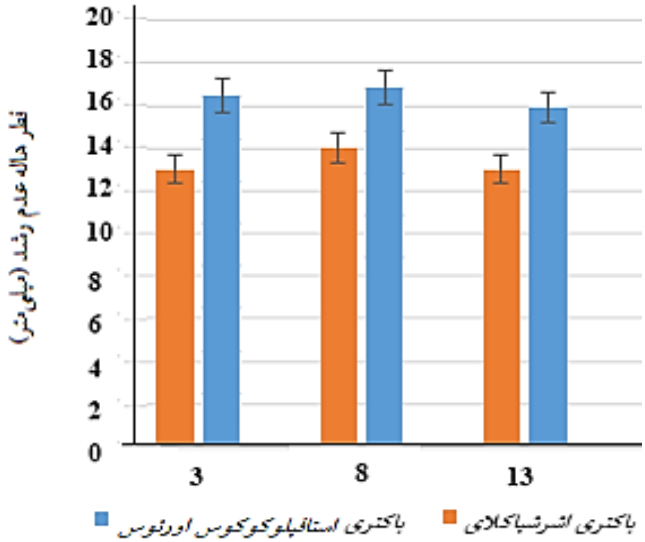
شکل ۲: نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌های پروبیوتیک. چاهک‌های ۱ تا ۹ عدم تشکیل بیوفیلم توسط ۳ جدایه مورد بررسی در ۳ تکرار. چاهک‌های ۱۰ تا ۱۲ کنترل مثبت

فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها به روش انتشار از چاهک

پس از جداسازی و شناسایی سویه‌های پروبیوتیکی، فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت آنها که از طریق سانتریفیوژ جداسازی شده بود، بر علیه دو سویه بیماری‌زای *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلای* به کمک روش چاهک با ۳ بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت که اثر مثبتی در برداشت و تمام گونه‌ها توانستند باکتری‌های بیماری‌زا را مهار کنند. قطر هاله‌های عدم رشد در آزمایش مهارکنندگی آنها از ۱۲ تا ۱۶ میلی متر متغیر بود که نشان می‌دهد همه جدایه‌ها بدون

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

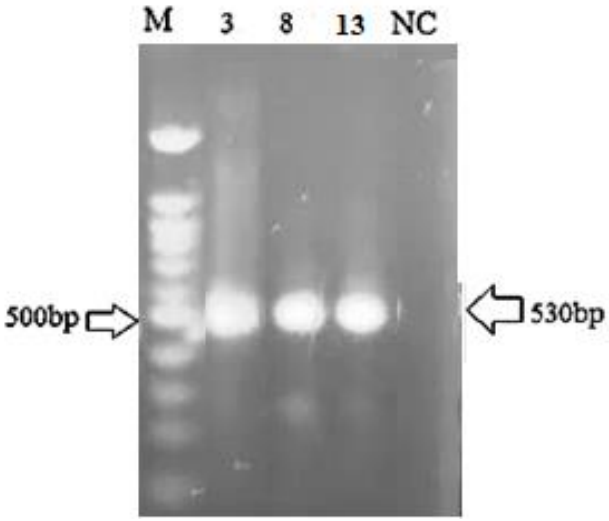
اختلاف معنی‌دار از یکدیگر اثر مهاری مناسبی بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد مطالعه داشتند (شکل ۳).



شکل ۳: فعالیت ضدمکیروبی سویه‌های جداسازی شده بر علیه *اشرشیا کلای* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

شناسایی مولکولی سویه‌ها

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



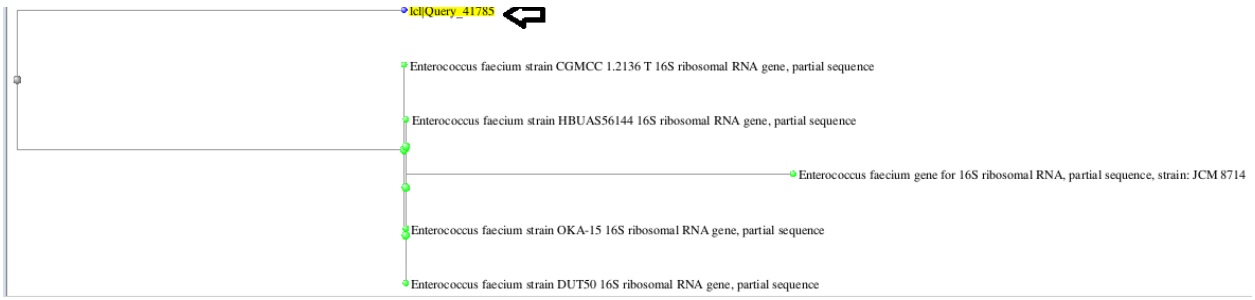
شکل ۴: بررسی محصولات PCR تکثیر بخشی از ژن ۱۶S rRNA در ژل آگارز ۱٪. چاهک اول مارکر اندازه DNA (M)، چاهک‌های دوم تا چهارم ژن تکثیر شده در جدایه‌های باکتریایی ۳، ۸ و ۱۳ با باند حدود ۵۳۰ جفت بازی، چاهک پنجم کنترل منفی (NC) است.

نتایج شناسایی گونه باکتری‌های جداسازی شده که در NBCI به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی قرار گرفت، در جدول ۵ آمده است. شکل‌های ۵ تا ۷ نتیجه بررسی همولوژی و دندروگرام‌های هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه را بعد از مقایسه هردو توالی رفت و برگشت و اصلاحات لازم نشان می دهد.

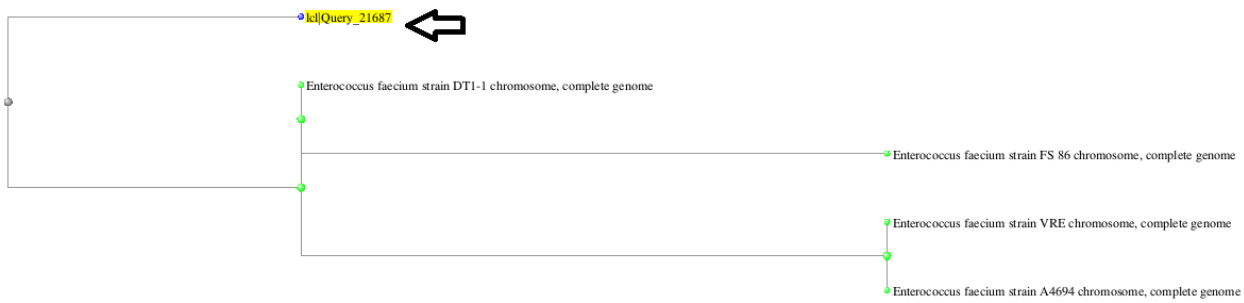
[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

جدول ۵. سویه‌های پروبیوتیک شناسایی شده در محصولات لبنی

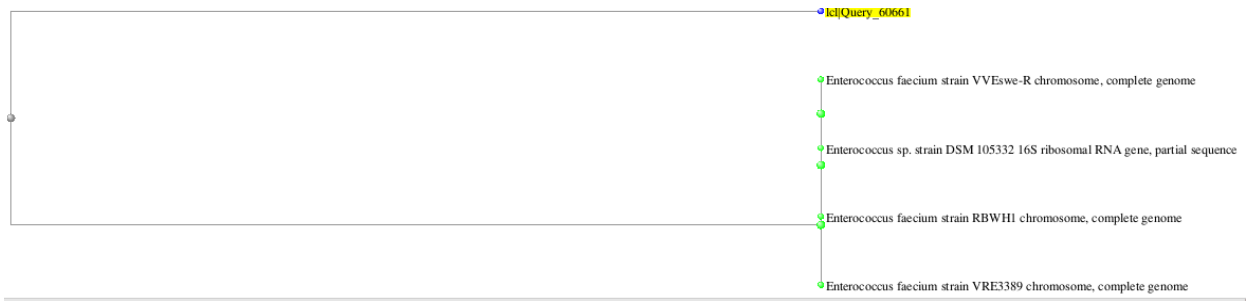
نام جدایه	منشا، جداسازی سویه	نام گونه	نام سویه ثبت شده در بانک جهانی ژن	شماره دسترسی بانک جهانی ژن
۳	پنیر گلپایگان	*انتروکوکوس فاسیوم*	SBAM-IAUF-1	MZ853942
۸	ماست گلپایگان	*انتروکوکوس فاسیوم*	SBAM-IAUF-2	MZ854204
۱۳	پنیر فریدن	*انتروکوکوس فاسیوم*	SBAM-IAUF-5	MZ902025



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



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



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

بحث

مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا، به خصوص پاتوژن‌های گرم منفی، در کنار سایر خواص پروبیوتیک‌ها مانند کاهش پاسخ التهابی روده (۱۵) و کاهش کلسترول از طریق جذب آن (۱۶) موجب شده است از این میکروارگانیسم‌ها در محصولات غذایی، به خصوص محصولات لبنی در سطح وسیعی استفاده شود. پروبیوتیک‌ها اثر خود را بر عوامل پاتوژن از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی (۱۷)، خنثی کردن ترکیبات مضر پاتوژن‌ها مانند انتروتوکسین‌ها، آمونیاک و آمینواسیدهای سمی، تقویت ایمنی (افزایش

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

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

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

[24] *Lactococcus lactis*
[25] *Lactiplantibacillus plantarum*
[26] *Limosilactobacillus fermentum*
[27] *Lactiplantibacillus plantarum*
[28] *Lacticaseibacillus*
[29] Caco-2

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

انتروکوکوس فاسیوم در مطالعات دیگر نیز از منابع لبنی جداسازی شده‌اند و به عنوان باکتری پروبیوتیک مطرح شده‌اند (۲۸، ۲۹). در مطالعه حاضر، سویه‌های جدید *انتروکوکوس فاسیوم* دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلای* بودند و می‌توان در مطالعات بعدی از آنها به تنهایی یا به صورت کنسرسیوم ترکیبی با سایر پروبیوتیک‌های جداسازی شده در مطالعات ضد میکروبی و ضد سرطان استفاده کرد. همچنین با توجه به این که توانایی اسیدی کردن سویه‌های پروبیوتیک یکی از مهمترین ویژگی‌های آنها در محصولات لبنی است، از این سویه‌ها می‌توان در فن‌آوری تولید مکمل‌های غذایی و کشت‌های آغازگر حاوی پروبیوتیک استفاده کرد، زیرا با عبور از شرایط اسیدی معده و صفرا، می‌توانند با کاهش pH رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و/یا میکروارگانیسم‌هایی که مسئول فساد هستند را مهار کنند و خواص محصولات لبنی را از طریق کنترل پاتوژن‌ها بهبود بیشتری ببخشند (۳۰). برای درک کامل مکانیسم‌های عمل باکتری‌های جداسازی شده و تأیید ایمنی آنها، آزمایش‌های in vivo توصیه می‌شود.

نتیجه‌گیری

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

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

منابع

1. Abatenh E, Gizaw B, Tsegay Z, Tefera G, Aynalem E. Health benefits of probiotics. J Bacteriology and Infectious Disease. 2018;2(1).
2. Hou K, Wu ZX, Chen XY, Wang JQ, Zhang D, Xiao C, Zhu D, Koya JB, Wei L, Li J, Chen ZS. Microbiota in health and diseases. Signal transduction and targeted therapy. 2022 Apr 23;7(1):1-28.
3. Wang B, Yao M, Lv L, Ling Z, Li L. The human microbiota in health and disease. Engineering. 2017;3(1):71-82.
4. Zommiti M, Feuilloley MG, Connil N. Update of probiotics in human world: a nonstop source of benefactions till the end of time. Microorganisms. 2020;8(12):1907.
5. Al-Fakhrany OM, Elekhnawy E. Next-generation probiotics: the upcoming biotherapeutics. Molecular Biology Reports. 2024;51(1):505.
6. Yamada T, Shimizu K, Ogura H, Asahara T, Nomoto K, Yamakawa K, Hamasaki T, Nakahori Y, Ohnishi M, Kuwagata Y, Shimazu T. Rapid and sustained long-term decrease of fecal short-chain fatty acids in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2015;39(5):569-77.
7. da Silva AR, de Souza de Azevedo PO, Converti A, de Souza Oliveira RP. Cultivation of lactic acid bacteria and evaluation of the antimicrobial potential of partially purified bacteriocin-like inhibitory substances against cariogenic and food pathogens. Fermentation. 2022;8(8):400.
8. Aleman RS, Yadav A. Systematic review of probiotics and their potential for developing functional nondairy foods. Applied Microbiology. 2023;4(1):47-69.
9. Bergey DH. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins; 1994.
10. Chen Z, Leng X, Zhou F, Shen W, Zhang H, Yu Q, Meng X, Fan H, Qin M. Screening and identification of probiotic lactobacilli from the infant gut microbiota to alleviate lead toxicity. Probiotics and antimicrobial proteins. 2023;15(4):821-31.
11. Asadi A, Lohrasbi V, Abdi M, Mirkalantari S, Esghaei M, Kashanian M, Oshaghi M, Talebi M. The probiotic properties and potential of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from healthy women against some vaginal pathogens. Letters in Applied Microbiology. 2022;74(5):752-64.
12. Wei C, Luo K, Wang M, Li Y, Pan M, Xie Y, Qin G, Liu Y, Li L, Liu Q, Tian X. Evaluation of potential probiotic properties of a strain of *Lactobacillus plantarum* for shrimp farming: from beneficial functions to safety assessment. Frontiers in Microbiology. 2022;13:854131.
13. Jebali N, Rabbani Khorasgani M, Kianfar M, Emami H. Evalution of the effects of honey, vinegar and rosewateron adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Journal of Isfahan Dental School. 2016;12(3):232-247
14. Ben-Dov E, Siboni N, Shapiro OH, Arotsker L, Kushmaro A. Substitution by inosine at the 3′-ultimate and penultimate positions of 16S rRNA gene universal primers. Microbial Ecology. 2011;61:1-6.
15. Wang W, Zhu LJ, Leng YQ, Wang YW, Shi T, Wang WZ, Sun JC. Inflammatory response: a crucial way for gut microbes to regulate cardiovascular diseases. Nutrients. 2023;15(3):607.
16. Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. International Journal of Molecular Sciences. 2010;11:2499-2522.
17. Fijan S. Probiotics and their antimicrobial effect. Microorganisms. 2023;11(2):528.
18. Wang X, Zhang P, Zhang X. Probiotics regulate gut microbiota: an effective method to improve immunity. Molecules. 2021;26(19):6076.
19. Cerdó T, García-Santos JA, G. Bermúdez M, Campoy C. The role of probiotics and prebiotics in the prevention and treatment of obesity. Nutrients. 2019;11(3):635.
20. Champagne CP, Gardner NJ. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. Food Research International. 2008;41(5):539-43.
21. Barman S, Ghosh R, Mandal NC. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. Annals of Agrarian Science. 2018;16(3):286-96.
22. Ko HI, Jeong CH, Hong SW, Eun JB, Kim TW. Optimizing conditions in the acid tolerance test for potential probiotics using response surface methodology. Microbiology Spectrum. 2022;10(4):e01625-22.
23. Sankarapandian V, Venmathi Maran BA, Rajendran RL, Jogalekar MP, Gurunagarajan S, Krishnamoorthy R, Gangadaran P, Ahn BC. An update on the effectiveness of probiotics in the prevention and treatment of cancer. Life. 2022;12(1):59.
24. Wang L, Li S, Fan H, Han M, Xie J, Du J, Peng F. *Bifidobacterium lactis* combined with *Lactobacillus plantarum* inhibit glioma growth in mice through modulating PI3K/AKT pathway and gut microbiota. Frontiers in Microbiology. 2022;13:986837.
25. Tuo Y, Song X, Song Y, Liu W, Tang Y, Gao Y, Jiang S, Qian F, Mu G. Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. Journal of dairy science. 2018;101(6):4822-9.
26. da Silva Sabo S, Vitolo M, González JM, de Souza Oliveira RP. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Research International. 2014;64:527-36.
27. Martinez FA, Domínguez JM, Converti A, de Souza Oliveira RP. Production of bacteriocin-like inhibitory substance by *Bifidobacterium lactis* in skim milk supplemented with additives. Journal of Dairy Research. 2015;82(3):350-5.
28. Dikbaş N, Orman YC, Alım Ş, Uçar S, Tülek A. Evaluating *Enterococcus faecium* 9 N-2 as a probiotic candidate from traditional village white cheese. Food Science & Nutrition. 2024;12(3):1847-56.
29. Dumitru M, Rizea D, Ciurescu G. Evaluation of the probiotic potential of NCIMB 11181 as a possible candidate in animal nutrition. Archiva Zootechnica. 2023;26(1):114-27.
30. Jawan R, Abbasiliasi S, Mustafa S, Kapri MR, Halim M, Ariff AB. In vitro evaluation of potential probiotic strain *Lactococcus lactis* Gh1 and its bacteriocin-like inhibitory substances for potential use in the food industry. Probiotics and antimicrobial proteins. 2021;13:422-40.

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]

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

Nasrin Seyed Ghaleh[1], **Keyvan Beheshti-Maal[1*]**, Ramesh Monajemi[2], Ali Mohammad Ahadi[3]

1. Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
2. Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3. Department of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Abstract

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

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

* kbeheshtimaal@yahoo.com

[Downloaded from amfi.ir on 2025-12-26]