



## جداسازی، شناسایی و بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از ماست های 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 پروبیوتیک ها در ایجاد تعادل در میکروبیوتا، تنظیم عملکرد سیستم ایمنی، جلوگیری از بروز و عود بیماری های عفونی، بهبود اختلالات گوارشی و بسیاری از مزایای دیگر به اثبات رسیده است. بررسی ها در محصولات تخمیری سنتی و محلی باعث جداسازی باکتری های اسید لاکتیک در جنس های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم و استرپتوکوکوس شده است که معمولاً به عنوان پروبیوتیک شناخته می شوند. در این مطالعه از سه ماست محلی مربوط به شهرستان بناب برای جداسازی پروبیوتیک ها استفاده شد. خواص پروبیوتیکی از جمله: مقاومت به اسید، مقاومت به نمک های صفراوی، هیدرولیز کلاسترول و املاح صفراوی، خاصیت ضد میکروبی و ویژگی های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خودتجمعی و تجمع مشترک مورد مطالعه قرار گرفتند و در نهایت جدایه های منتخب برای شناسایی مولکولی ارزیابی شدند. از این سه محصول، ۱۱ جدایه بررسی شدند، که ۷ جدایه به لاکتوباسیلوس ها و ۴ جدایه به استرپتوکوک ها تعلق داشتند. اکثر جدایه ها در دو یا سه خصوصیت دارای پتانسیل پروبیوتیک بودند، ولی در این میان، ۲ جدایه نتایج بهتری در اکثر تست های ارزیابی پروبیوتیک ها نشان دادند. این جدایه ها با استفاده از PCR برای بررسی 16S rRNA مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از توالی یابی و بررسی توالی ها مشخص شد که یک جدایه به لاکتوباسیلوس کازئی و جدایه دیگر به لاکتوباسیلوس رامنوسوس با تشابه بیش از ۹۹ درصد تعلق دارند. این مطالعه تأیید می کند که محصولات لبنی سنتی منبع مهمی برای جداسازی باکتری های پروبیوتیک می باشند. بنا بر این شناسایی و بهینه سازی جدایه های بومی که در اکثر بررسی ها، پتانسیل پروبیوتیکی بهتری دارند می تواند مسیر را برای تولید مکمل ها و محصولات پروبیوتیک جدید، هموار کند.

**کلمات کلیدی:** باکتری پروبیوتیک، محصولات سنتی تخمیری، لاکتوباسیلوس، استرپتوکوک، 16S rRNA

\* biotechmm2016@gmail.com

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 پروبیوتیک ها استفاده شد. خصوصیات پروبیوتیکی مانند: مقاومت به اسید، مقاومت به نمک های صفاوی، هیدرولیز کلسترول و املاح صفاوی، خاصیت ضد میکروبی و ویژگی های فیزیولوژیکی مانند: آبگریزی، خود تجمعی و تجمع 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 لاکتیک

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 پروبیوتیک های بالقوه و ارزیابی آن ها انجام شد.

نمونه ها با استفاده از آب پیتون ۱ درصد (شرکت سیگما، آمریکا) رقیق شدند. تکنیک pour-plate با استفاده از محیط MRS Agar (شرکت مرک، آلمان) و M17 Agar (شرکت مرک، آلمان) انجام شد و پلیت ها به صورت بی هوازی در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ h ساعت در انکوباتور گرماگذاری 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 (۵۰ mL 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 آن ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  پیش از بررسی ویژگی های پروبیوتیک انجام شد.

محیط کشت رشد یافته در دور  $500 \times g$  به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد، پس از خالی کردن مایع رویی، رسوب با بفر فسفات (PBS)  $0.1\text{M}$  ( $\text{pH}=7$ ) شستشو داده شد، پس از

اثر بخشی پروبیوتیک ها بر سلامت انسان، موجب شده است که این میکروارگانیسم ها به عنوان مکمل غذایی و دارویی مورد توجه پژوهشگران حوزه سلامت قرار گیرند (۱). بهبود عملکرد سیستم ایمنی، ایجاد تعادل در میکروبیوتا، جلوگیری از بروز و عود بیماری های عفونی و اختلالات گوارشی، تنظیم شرایط التهابی، کاهش اثرات عدم تحمل لاکتوز و جلوگیری از سرطان کولورکتال از خصوصیات پروبیوتیک ها هستند؛ که در مطالعات متعددی بررسی شده اند (۲). همچنین؛ پروبیوتیک ها نقش ارزنده ای در درمان آلرژی و آگزما، تنظیم چربی خون و کنترل وزن دارند (۳، ۴). این میکروارگانیسم های تخمیری در روده زنده می مانند و با روش های متعددی به نفع میزبان عمل می کنند. مکانیسم های اساسی عملکردی پروبیوتیک ها شامل: تقویت سد مخاطی روده، افزایش چسبندگی به سلول های روده ای، حذف رقابتی 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: اگزوپلی ساکاریدها، استیل کولین، اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، اسید  $\gamma$ -آمینو بوتیریک و سروتونین انجام می گیرند (۵).

باکتری های اسید لاکتیک (LAB) مانند: لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، لاکتوکوکوس و استرپتوکوکوس معمولاً به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته می شوند (۶). مطالعات بسیاری بر یافتن سویه های جدید پروبیوتیک و بررسی بیشتر طریقه عملکرد آنها معطوف شده است. یکی از مشهورترین پروبیوتیک های تخمیرکننده اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس ها هستند که به طور سنتی در تخمیر سبزیجات، گوشت و خصوصاً لبنیات استفاده می شوند. گونه هایی از این میکروارگانیسم ها، به همراه استرپتوکوکوس 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 مخلوط شده و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری شد. در زمان های صفر، یک، دو، سه، چهار و ۲۴ ساعت پس از گرماگذاری، ۱ mL از هر محیط تلقیح شده برداشته و پس از تهیه رقت‌های مناسب با رقیق کننده آب پیتونه ۰/۱ درصد به روش پورپلیت در محیط کشت MRS Agar یا M17 Agar کشت داده شد و به مدت ۴۸ h تا ۷۲ h در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری شد. در نهایت تعداد میکروارگانیسم‌ها شمارش شد.

### مقاومت به نمک های صفراوی

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

$$C_{inh} = \frac{(T8 - T0)_{\text{Control}} - (T8 - T0)_{\text{Treatment}}}{(T8 - T0)_{\text{Control}}}$$

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

### فعالیت هیدرولیز کلاسترول و نمک های صفراوی

برای تعیین فعالیت هیدرولیز کلاسترول و نمک های صفراوی، اسیدهای آمینه آزاد شده از نمک های 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 فارلند رسانده شد.

### بررسی های بیوشیمیایی

جدایه‌ها جهت رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز بررسی شدند و در غلظتهای ۶ و ۶.۵ درصد کلرید سدیم در محیط کشت MRS Broth و M17 Broth در دماهای  $34^{\circ}\text{C}$  و  $39^{\circ}\text{C}$  کشت داده شدند (۸).

جدایه‌ها جهت تخمیر کربوهیدرات‌ها طبق روش هاریگان و مک کانس بررسی گردیدند (۹). محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوکز و عصاره گوشت و با افزودن فنل قرمز تهیه گردید. همه قندها شامل: گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، لاکتوز، اینوزیتول، ترهالوز، رامنوز، ریوز، زیلوز، ساکارز و سلویوز به صورت محلول استوک ۴ درصد تهیه و به وسیله یک فیلتر غشایی  $0.45\ \mu\text{m}$  استریل شدند. سپس ۴.۵ mL از محلول قندهای استریل به ۴.۵ mL محیط کشت پایه افزوده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۲۴ h کشت داده شدند و  $50\ \mu\text{L}$  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  $100\ \mu\text{L}$  از سوسپانسیون میکروبی را در تعداد مناسب لوله‌های حاوی ۱۰ mL محیط کشت مایع مناسب با پایه MRS Broth که اسیدیته آنها بوسیله اسید کلریدریک در دو pH ۴ و ۲/۵ تنظیم شده بود کشت داده شد و در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  گرماگذاری شد. پس از گذشت ۳ h و ۴ h از گرماگذاری در آنکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$ ، از محیط های کشت مایع ذکر شده، ۱ 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 (پسین، تریپسین)

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  $\text{CO}_2$  گرماگذاری 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 نوترکیب، ایران) بدون مکمل با غلظت  $10^7$  CFU/mL تا  $10^8$  مجدداً تلقیح شدند. سوسپانسیون های باکتریایی به سلول های تک لایه Caco-2 اضافه شدند. پس از ۲ h گرماگذاری 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 چسبیده حذف شوند و سپس با ۱ درصد Triton X-100 (سیگما آلدریج، ایالات متحده) تیمار شدند. شمارش نهایی سلول های LAB زنده (LAB چسبیده) 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:

$$\text{Adhesion ability}(\%) = \left(\frac{A_t}{A_0}\right) \times 100$$

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

### تجمیع مشترک (Co-aggregation)

تجمیع مشترک یا هم انباشتگی جدایه ها با استفاده از سه پاتوژن (اشریشیا کلی ATCC13706، استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1826 و لیستریا مونوسیتوژنز PTCC 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 هوازی داده شد به طور همزمان، کشت ۲۴ h ساخته از گونه های پاتوژن

سدیم تائوروکولات یا مخلوط نمک صفراوی مزدوج حاوی  $6.0 \text{ mmol/L}$  اسید گلیکوکولیک، اسید گلیکوشنودوکسی کولیک، اسید تائوروکولیک و اسید تائوروکسی کولیک با استفاده از نین هیدرین در جذب  $570 \text{ nm}$  شناسایی شدند.

### آزمون خود تجمعی (Auto-aggregation)

آزمون خود تجمعی (اتو آگریگیشن) کشت های فعال بر اساس روش Gao و همکاران (۲۰۲۱) (۱۰) انجام شد و جذب در  $600 \text{ nm}$  در فواصل زمانی ۴، ۰ 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:

$$\text{Auto-aggregation}(\%) = \left(1 - \frac{A_t}{A_0}\right) \times 100$$

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

### اندازه گیری میزان آبگریزی

میزان آبگریزی میکروارگانیسم مورد نظر با استفاده از روش Ayyash و همکاران (۲۰۱۸) (۷)؛ با استفاده از hexadecane، xylene و یا octane (مرک، آلمان) انجام شد. محیط کشت مایع MRS Broth ۲۴ h در دور  $500 \times \text{g}$  و به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد. رسوب به وسیله ی بافر فسفات پتاسیم شستشو و پس از انحلال مجدد در ۵ mL از همین بافر، جذب نوری آن در  $600 \text{ nm}$  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  $600 \text{ nm}$  اندازه گیری شد. در نهایت درصد آبگریزی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Hydrophobicity}(\%) = \left(\frac{A - A_0}{A}\right) \times 100$$

که در آن، A جذب نوری در  $600 \text{ nm}$  و A<sub>0</sub> جذب نهائی است.

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

میکروارگانسیم لاکتیک بر روی پلیت‌های رشد کرده هر پلیت با مخلوط حجم ۱۰ mL محیط Mueller Hinton Agar (مرک، آلمان) و ۱۰۰ µL از هر باکتری پاتوژن پوشیده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h به صورت هوازی در دمای ۳۷ °C گرماگذاری 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 بازدارندگی قوی، مناطق ۱۰ mm تا ۲۰ mm پتانسیل بازدارندگی متوسط و مناطق کمتر از ۱۰ mm نشان‌دهنده فعالیت بازدارندگی 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 پلیمرز PCR در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده ژن rRNA 16S برای شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها (۱۳)

طول قطعه	توالی پرایمر	نوع	منبع
	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	F	(۱۳)
۱۵۰۰ bp	5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	R	

شرایط واکنش زنجیره ای پلیمرز PCR شامل: دمای دناتوراسیون اولیه ۹۴ °C به مدت زمان ۵ min، ۳۵ سیکل شامل ۱ min 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 پلیمریزاسیون نهایی به مدت ۱۵ min در دمای ۷۲ °C انجام گرفت. در الکتروفورز باند به اندازه ۱۵۰۰ bp محصول PCR مشخص کننده لاکتوباسیلوس‌ها 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 ۱۰۰۰ 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 گرماگذاری 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:

$$Co - aggregation(\%) = (1 - \frac{At}{A0}) \times 100$$

که در آن "At" جذب در زمان "t" و "A0" جذب در زمان 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: اشریشیا کلی ATCC 13706، استافیلوکوکوس اورئوس PTCC1826، لیستریا مونوسییتوزنتر PTCC1299، اتروکوکوس فکالیس ATCC33186، سودوموناس آئروژینوزا PTCC1690 و سالمونلا پارا تیفی ATCC 9150 بودند (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، ایران). با استفاده از روش چاهک گذاری این خاصیت مورد ارزیابی قرار گرفت. دو میکرولیتر از کشت ۲۴ h جدایه کاندید پروبیوتیک به صورت یک چاهک روی سطح پلیت MRS Agar تلقیح شد. پلیت‌ها به مدت ۳۰ min دقیقه در دمای اتاق خشک شدند و سپس به مدت ۲۴ h تا ۴۸ h در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شدند. از طرف دیگر هر باکتری پاتوژن با استفاده کشت شبانه در محیط Nutrient Broth (مرک، آلمان) در دمای ۳۷ °C کشت داده شد و با استفاده از نیم مک فارلند به میزان CFU/mL<sup>۶</sup> ۱۰ استاندارد شد. پس از رشد

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

نام نمونه	نامگذاری جدایه ها	تعیین جنس جدایه ها
Y1	Y1A, Y1B, Y1C, Y1D	لاکتوباسیلوس
Y2	Y2A, Y2B, Y2C	استرپتوکوک
Y3	Y3A, Y3B, Y3C, Y3D	استرپتوکوک

### 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 لاکتوباسیلوس ها بودند و از ۶ جدایه با مقاومت متوسط ۲ جدایه مربوط به استرپتوکوک ها و ۴ جدایه جزء لاکتوباسیل ها بودند. در نهایت، از جدایه های با مقاومت پایین، یک جدایه مربوط به استرپتوکوک ها و دو جدایه از لاکتوباسیل 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 پارامترهای 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 ها با  $p < 0.05$  معنی دار در نظر گرفته شدند.

### نتایج

از سه نمونه محصول ماست سنتی شهرستان بناب، در کل ۱۱ نوع کلنی باکتری های لاکتیک جداسازی گردید. نتایج بررسی مورفولوژیک و تست های بیوشیمیایی نشان داد که ۷ کلنی به لاکتوباسیلوس ها و ۴ کلنی به استرپتوکوک 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  $CFU \times 10^9$

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

0.55	Y1A
0.52	Y1B
0.57	Y1C
0.35	Y1D
0.75	Y2A
0.59	Y2B
0.63	Y2C
0.62	Y3A
0.49	Y3B
0.27	Y3C
0.36	Y3D

با بررسی ۱۱ جدایه نسبت به شیره معده (پسین و تریپسین) مشخص شد که از میان جدایه‌های مورد بررسی ۴ جدایه مقاومت نشان دادند که شامل جدایه های Y1D، Y2B، Y3A و Y3C بودند. در این میان فقط جدایه‌های Y1D و Y3C بعد از ۲۴ ساعت دارای شمارش میکروبی بیش از ۱۰<sup>۶</sup> CFU/mL بودند و بقیه مقادیر کمتری نشان دادند.

### نتایج مقاومت به نمک های صفاوی

جدول ۴ نتایج به دست آمده مبنی بر مقاومت جدایه‌های مورد بررسی نسبت به نمک‌های صفاوی را نشان می‌دهد. بر طبق فرمول ذکر شده اعداد C<sub>inh</sub> کمتر از ۰.۴ نشان دهنده مقاومت مناسب جدایه نسبت به املاح صفاوی است. از ۱۱ جدایه مورد بررسی Y1D، Y3C و Y3D مقاومت بالا و قابل قبولی نسبت به املاح صفاوی نشان دادند که هر سه از لاکتوباسیلوس‌ها هستند و جدایه‌های دیگر که مقاومت متوسطی نسبت به املاح صفاوی داشتند شامل: Y1B، Y1C و Y3B بودند که تنها Y1C جزء استرپتوکوک‌ها و بقیه از جنس لاکتوباسیل‌ها هستند.

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

نام جدایه	ضرب بازدارندگی (C <sub>inh</sub> ) جدایه ها بعد از ۸ ساعت گرم‌گذاری
-----------	---

جدول ۵: نتایج مربوط به هیدرولیز کلاسترول و املاح صفاوی

نام جدایه	هیدرولیز کلاسترول (درصد)	هیدرولیز املاح صفاوی (U/mg)
Y1A	21.1 ± 2.05 <sup>b*</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>a</sup>
Y1B	12.4 ± 1.25 <sup>d</sup>	0.44 ± 0.02 <sup>a</sup>
Y1C	34.2 ± 1.27 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.01 <sup>a</sup>
Y1D	11.5 ± 0.05 <sup>d</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>ab</sup>
Y2A	20.6 ± 0.59 <sup>cd</sup>	0.64 ± 0.01 <sup>b</sup>
Y2B	21.4 ± 1.54 <sup>c</sup>	0.61 ± 0.06 <sup>ab</sup>
Y2C	14.7 ± 2.36 <sup>e</sup>	0.51 ± 0.01 <sup>c</sup>
Y3A	8.8 ± 3.18 <sup>f</sup>	0.26 ± 0.01 <sup>a</sup>
Y3B	17.6 ± 0.05 <sup>e</sup>	0.8 ± 0.05 <sup>cd</sup>
Y3C	36.2 ± 1.13 <sup>a</sup>	1.01 ± 0.01 <sup>a</sup>
Y3D	11.3 ± 0.06 <sup>e</sup>	0.13 ± 0.06 <sup>e</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).

### نتایج مربوط به هیدرولیز کلاسترول و املاح صفاوی

نتایج مربوط به هیدرولیز کلاسترول و املاح صفاوی در جدول ۵ نشان داده شده است. طبق نتایج ارائه شده همه جدایه‌ها دارای خاصیت هیدرولیز املاح صفاوی هستند. در این میان بیشترین هیدرولیز مربوط به املاح صفاوی مربوط به جدایه Y3C و کمترین هیدرولیز مربوط به جدایه Y3D بوده است. در ارتباط با کلاسترول نیز بیشترین هیدرولیز کلاسترول در جدایه Y3C اتفاق افتاد و کمترین فعالیت هیدرولیز کلاسترول نیز در ارتباط با Y3A بوده است.

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

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 اپیتلیال مربوط به Y1B به میزان  $10^{10} \times 8.3$  CFU/mL و کمترین میزان آن مربوط به Y3B به میزان  $10^{10} \times 6.4$  CFU/mL بود. در این میان اکثر جدایه ها دارای چسبندگی مناسبی به سلول های اپیتلیال بودند و همگی دارای مقادیر بالای باکتری (بیش از  $10^{10}$  CFU/mL) بودند.

نتایج آزمون های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول های اپیتلیال 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 اپیتلیال روده (Caco-2)

نام جدایه	نتایج آزمون خود تجمعی (اتواگریگاسیون)		نتایج آزمون اتصال به رده سلولی Caco-2 (پس از ۲h) (مقادیر کانت در لوگ ۱۰ می باشد)
	۴h (درصد)	۲۴h (درصد)	
Y1A	$2.03 \pm 0.43^{e*}$	$63.6 \pm 0.59^c$	$7.4 \pm 0.04^c$
Y1B	$1.46 \pm 0.55^i$	$56.4 \pm 1.23^f$	$8.3 \pm 0.01^a$
Y1C	$3.64 \pm 0.61^d$	$49.5 \pm 2.11^g$	$7.7 \pm 0.02^c$
Y1D	$4.09 \pm 0.03^a$	$71.9 \pm 1.45^a$	$7.4 \pm 0.05^c$
Y2A	$2.45 \pm 0.57^e$	$48.7 \pm 2.39^g$	$6.8 \pm 0.01^f$
Y2B	$4.47 \pm 0.29^f$	$57.3 \pm 0.71^f$	$7.9 \pm 0.02^b$
Y2C	$2.41 \pm 0.59^i$	$60.6 \pm 1.39^c$	$7.6 \pm 0.02^c$
Y3A	$3.08 \pm 0.16^f$	$53.2 \pm 2.09^c$	$7.8 \pm 0.04^b$
Y3B	$4.91 \pm 0.13^f$	$61.1 \pm 0.69^f$	$6.4 \pm 0.01^i$
Y3C	$2.33 \pm 0.76^j$	$55.4 \pm 1.23^g$	$7.9 \pm 0.02^b$
Y3D	$2.57 \pm 0.09^i$	$64.4 \pm 1.38^f$	$6.5 \pm 0.01^g$

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

آن در جدول ۷ مشخص شده است. نتایج نشان داد که Y3C دارای اثر قوی و بالای تجمع مشترک نسبت به هر سه پاتوژن مورد بررسی است و از طرف دیگر جدایه های Y3B و Y1B دارای کمترین اثر تجمع مشترک با پاتوژن ها هستند.

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

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

جدول ۷: نتایج آزمون های تجمع مشترک با سه پاتوژن اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیژنوز

نام جدایه	درصد Co-aggregation	
اشریشیا کلی	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا مونوسیژنوز
$7.1 \pm 0.35^d$	$12.3 \pm 0.63^b$	$6.2 \pm 0.32^{f*}$



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

### 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

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

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

نام جدایه	اشربشیا کلی	استافیلوکوکوس اورئوس	لیستریا منوسیتوژنز	اتروکوکوس فکالیس	سودوموناس آنروژینوزا	سالمونلا پاراتیفی
Y1A	16 ± 5 <sup>b*</sup>	24 ± 6 <sup>a</sup>	22 ± 2 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>a</sup>	12 ± 2 <sup>d</sup>	26 ± 4 <sup>a</sup>
Y1B	17 ± 2 <sup>b</sup>	18 ± 2 <sup>b</sup>	16 ± 4 <sup>d</sup>	16 ± 4 <sup>b</sup>	13 ± 2 <sup>d</sup>	17 ± 2 <sup>c</sup>
Y1C	24 ± 6 <sup>a</sup>	20 ± 5 <sup>b</sup>	18 ± 2 <sup>c</sup>	8 ± 1 <sup>d</sup>	15 ± 3 <sup>c</sup>	15 ± 5 <sup>cd</sup>
Y1D	26 ± 2 <sup>a</sup>	21 ± 5 <sup>c</sup>	26 ± 6 <sup>a</sup>	13 ± 2 <sup>c</sup>	14 ± 2 <sup>c</sup>	11 ± 3 <sup>e</sup>
Y2A	10 ± 5 <sup>c</sup>	24 ± 2 <sup>a</sup>	19 ± 3 <sup>b</sup>	17 ± 4 <sup>b</sup>	16 ± 6 <sup>b</sup>	17 ± 5 <sup>c</sup>
Y2B	.	25 ± 3 <sup>a</sup>	25 ± 7 <sup>a</sup>	16 ± 6 <sup>b</sup>	16 ± 4 <sup>b</sup>	13 ± 2 <sup>e</sup>
Y2C	21 ± 4 <sup>a</sup>	16 ± 2 <sup>c</sup>	15 ± 3 <sup>d</sup>	17 ± 3 <sup>b</sup>	13 ± 4 <sup>d</sup>	21 ± 6 <sup>b</sup>
Y3A	14 ± 3 <sup>c</sup>	18 ± 4 <sup>b</sup>	23 ± 7 <sup>ab</sup>	9 ± 2 <sup>d</sup>	19 ± 2 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>bc</sup>
Y3B	11 ± 1 <sup>c</sup>	17 ± 2 <sup>c</sup>	20 ± 4 <sup>b</sup>	15 ± 2 <sup>c</sup>	11 ± 4 <sup>e</sup>	17 ± 5 <sup>c</sup>
Y3C	28 ± 5 <sup>a</sup>	26 ± 6 <sup>a</sup>	27 ± 3 <sup>a</sup>	19 ± 4 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>a</sup>	29 ± 5 <sup>a</sup>
Y3D	24 ± 2 <sup>c</sup>	22 ± 4 <sup>a</sup>	19 ± 3 <sup>b</sup>	13 ± 5 <sup>c</sup>	10 ± 5 <sup>e</sup>	20 ± 7 <sup>b</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).

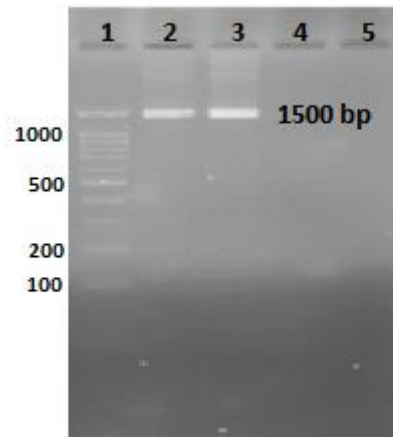
در میان ۱۱ جدایه مورد بررسی ۲ جدایه نتایج بهتری در اکثر تست‌های ارزیابی پروبیوتیک‌ها داشتند. این جدایه‌ها با استفاده از PCR ژن 16S rRNA مورد ارزیابی قرار گرفته و تایید شدند (شکل ۱). پس از توالی‌یابی و blast شدن توالی‌ها در سایت NCBI مشخص شد که جدایه Y1D، مربوط به

لاکتوباسیلوس کارژی با تشابه ۹۹ درصد و جدایه Y3C مربوط به لاکتوباسیلوس رامنوسوس با تشابه ۹۹ درصد هستند.

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

یکی از ملاک های بررسی پروبیوتیک ها مقاومت به اسید است (۱۵)؛ چرا که میکروارگانیسم هایی که دارای خواص پروبیوتیکی 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 مشابهت 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 تلقیح اولیه کاسته شد. این نتایج با مطالعات دیگری مثل Tarique و همکاران (۲۰۲۲)، Ayyash و همکاران (۲۰۱۸) و Yasmin 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 پروبیوتیک بودن یک باکتری را نشان می دهد مقاومت به شیره گوارشی شبیه سازی شده دارای آنزیم های تریپسین و پپسین است. در مطالعه حاضر از ۱۱ جدایه، ۴ جدایه به شیره معده (پپسین 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 کمتری نشان دادند. در بسیاری از مطالعات انجام شده بر خلاف 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 Yasmin و همکاران (۲۰۲۰)؛ جدایه های



شکل ۱: PCR با پرایمر عمومی (یونیورسال) لاکتوباسیل ها و بدست آوردن باند نهایی ۱۵۰۰ جفت باز: ۱: Ladder ۱۰۰ جفت بازی، ۲: باند مربوط به جدایه YID ۳: باند مربوط به جدایه Y3C، ۴ و ۵: کنترل منفی.

## بحث و نتیجه گیری

امروزه اثرات سودمند پروبیوتیک ها بر همگان آشکار شده است (۲-۴). به علت تولید باکتریوسین ها و کاهش pH ناشی از تولید اسیدهای آلی، از این میکروارگانیسم ها می توان برای ماندگاری مواد غذایی نیز بهره برد (۱۳). از طرف دیگر، ارتباط محصولات لبنی سنتی با سلامت انسان مدتهاست که اثبات شده است و این محصولات به عنوان منبع جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از قبیل لاکتوباسیل ها و استرپتوکوک ها محسوب می شوند. پژوهشگران در مطالعات مختلف سعی کرده اند سویه های اسید لاکتیک با قابلیت پروبیوتیک 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 پروبیوتیکی مانند: مقاومت به اسید و محیط شبیه سازی شده معده، مقاومت به نمک های صفراوی، هیدرولیز کلسترول و املاح صفراوی، خاصیت ضد میکروبی

که بر روی محصولات تخمیری غیر لبنی انجام شده است اعداد بالاتری را نشان داده است که احتمالاً به تنوع محصولات و تفاوت در انواع میکروارگانیسم‌ها بستگی دارد (۲۲، ۱۰).

بیشترین میزان چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال به میزان  $10^{10} \times 8.3$  CFU/mL و کمترین آن به میزان  $10^{10} \times 6.4$  گزارش شد. در کل، اکثر جدایه‌ها دارای چسبندگی مناسبی به سلول‌های اپیتلیال بودند و همگی دارای مقادیر بالای باکتری (بیش از  $10^7$  CFU/mL) بودند. این خصوصیت در جهت پروبیوتیک بودن جدایه‌ها اهمیت بسزایی دارد و احتمال پروبیوتیک بودن آن‌ها را تأیید می‌کند. توانایی اتصال یک باکتری پروبیوتیک به سلول‌های اپیتلیال 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 (۲۲، ۱۵، ۱۰).

ویژگی دیگر ارزیابی پروبیوتیک‌ها، تجمع مشترک یا co-aggregation است که نشان دهنده اتصال هر جدایه به پاتوژن‌ها و ممانعت از اتصال پاتوژن‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده است. در این جدایه‌ها اثر تجمع مشترک یا co-aggregation دارای درصدهای متفاوت هستند که در مطالعات دیگر نیز دیده می‌شود (۱۵). این مقادیر در کل، در محصولات لبنی 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 پروبیوتیک 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 *Lactobacillus* بیشترین

مورد 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 پروبیوتیک‌ها، مقاومت به املاح صفراوی و حل شدن باکتری در مواجهه با کلسترول است. در این مطالعه اکثر جدایه‌ها مقاومت بالایی به املاح صفراوی 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 Tarique و همکاران، (۲۰۲۲)؛ Yerlikaya و Akbulut (۲۰۲۰)؛ مشابه است. هرچند تعداد اندکی از نتایج بسته به نوع جدایه بدست آمده؛ متفاوت هستند (۷، ۱۵، ۲۰).

برای ارزیابی خصوصیات دیگر باکتری‌های پروبیوتیک؛ نتایج آزمون‌های خود تجمعی، آبگریزی و اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده (Caco-2) مورد بررسی قرار گرفت. خودتجمعی ضامن ایجاد بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی است. در این مطالعه فاکتور خودتجمعی پس از ساعت ۴، در بالاترین میزان به عدد ۴۹۱ درصد و در کمترین میزان به عدد ۱۴۶ درصد رسید. پس از ۲۴ ساعت، بیشترین میزان خودتجمعی (۷۱۹ درصد) و کمترین میزان (۴۸۷ درصد) گزارش شد. این نتایج با بسیاری از مطالعات از جمله Tarique و همکاران (۲۰۲۲) و Alkalbani و همکاران (۲۰۱۹) مشابه است، هرچند نسبت به مطالعاتی مثل وسیعی و همکاران (۲۰۲۰) بالاتر به نظر می‌رسد (۱۵، ۲۱، ۲۲).

میزان آبگریزی نیز ضامن اتصال جدایه مورد بررسی با سلول‌های اپیتلیال است. در این تحقیق، در ۱۱ جدایه مورد بررسی؛ آبگریزی در مقادیر متفاوتی مشاهده گردید، که بسته به نوع جدایه مورد بررسی بین ۱۵۷ درصد و ۳۸۳ 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 پروبیوتیک می باشند. بنا بر این، شناسایی و بهینه سازی جدایه های بومی که در اکثر بررسی ها، پتانسیل پروبیوتیکی بهتری دارند می تواند مسیر را برای تولید مکمل ها و محصولات پروبیوتیک، 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 انتروکوکوس 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.

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, Karbalaeei M, Kobylak 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. Evivie 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, Tabatabaee-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-Tarabily 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