

جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش زنبور عسل در استان مرکزی

نیلوفر سلیمانی ۱، محسن زرگر ۲*، پروانه جعفری ۳

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

۲ عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

۳ عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران،

چکیده

زنبور عسل حشره ای مفید است که در طبیعت به واسطه گرده افشانی نقش مهمی دارد. دستگاه گوارش زنبور عسل دارای میکروارگانیسم های همزیست است. تحقیقات اخیر نشان داده میکروارگانیسم هایی مفید در زنبور عسل شناخته شده اند که در فعل و انفعالات بدن زنبور عسل شرکت دارند. استفاده از مکمل های پروبیوتیک در صنعت زنبورداری سبب افزایش سرعت رشد و بهبود ضریب تبدیل خوراک و بهبود مقاومت در مقابل بیماری و افزایش تولید عسل می شود. هدف از این پژوهش جداسازی باکتری های مفید دستگاه گوارش زنبور عسل در چند منطقه از استان مرکزی و بررسی شاخص های پروبیوتیکی جدایه ها است.

بر این اساس نمونه های زنبور عسل کارگر سالم از زنبورستان ها جداسازی و به آزمایشگاه جهت جداسازی دستگاه گوارش انتقال یافت. نمونه ها در محیط MRS براث در شرایط بی هوازی گرماگذاری و غنی سازی شدند. کلنی های کاتالاز منفی و همولایز منفی مورد آزمون تشخیص فیلوژنی قرار گرفتند. از مجموع باکتر یها یک جدایه لاکتوباسیل مورد آزمون شناسایی فیلوژنی قرار گرفت که از گونه لاکتوباسیلوس فارسیمینس بود. نتایج مطالعه حاضر بیانگر حضور باکتری های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش زنبور عسل است.

کلمات کلیدی: زنبور عسل، لاکتوباسیلوس فارسیمینس، پروبیوتیک

مقدمه

پروبیوتیک عبارت است از مکمل میکروبی که از طریق متعادل سازی میکروب های بومی طبیعی روده اثرات مفید بر بدن میزبان اعمال می کند (کارتیس و همکاران، ۱۹۹۱). بسیاری از گونه های پروبیوتیک به گروه بزرگی از باکتری ها به نام باکتری های اسیدلاکتیک تعلق دارند. این باکتری ها میکروب های بومی بدن انسان و دام بوده، اما به طور طبیعی در گیاهان نیز وجود دارند.

پروبیوتیک‌ها تنها به عنوان ترکیب غذایی خورده نمی‌شود، بلکه از زمانی که واژه پروبیوتیک در دهه ۱۹۹۱ توسط کولاد ابداع شده، لی لی و استیلول در سال ۱۹۹۹ این واژه را برای باکتری‌های زنده و اسپورها به عنوان مکمل غذایی حیوانی به کار بردند که باید به بهبود استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط حیوانی کمک می‌کند (کولاد ۱۹۹۳؛ استیلول، ۱۹۹۹). باکتری‌های اسید لاکتیک، گرم مثبت، میله‌ای و کوکسی شکل بدون اسپور هستند، مقاوم به هوا یا بی‌هوازی، اسیدوفیلیک یا اسیدوریک می‌باشند.

این باکتری‌ها در انواع متنوعی از زیستگاه‌ها وجود دارند که دارای سوبستراهای کربوهیدرات‌ها مثل غشاهای موکوسی انسانی و حیوانی یا گیاهی و ماده با منشأ گیاهی هستند (روتز، ۱۹۹۱). ماهش و همکارانش در سال ۲۱۱۲ بیان کردند میکروارگانسیم‌های موجود در روده حشرات نقش مهمی را در تغذیه حشرات دارند. لاکتوباسیل برای ترمیم اکوسیستم میکروبی روده نقش مهمی دارد به این خاطر ترویج خواص گونه‌های لاکتوباسیلوس به طور گسترده‌ای به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود (پاتاب هیراما و همکاران، ۲۱۱۲) (آندرسون و همکارانش در سال ۲۱۱۳ اکولوژی میکروبی را در کندوی زنبور عسل مورد بررسی قرار دادند. تقریباً تمام یوکاریوت‌ها میزبان باکتری‌های مفید در لومن روده‌ای خود هستند که این‌ها را یا به ارث می‌برند یا از محیط زیست دریافت می‌کنند. بنابراین شناسایی فنوتیپ‌های باکتری‌های مفید در زنبور عسل و کندو امری مهم است. نتایج نشان داد درجه حرارت، رطوبت، پتانسیل اسمزی محیط و pH شهد گل بر مجموعه باکتریایی روده زنبور عسل تاثیرگذار است) (آندرسون و همکاران، ۲۱۱۳). کلادو و همکارانش در سال ۲۱۱۲ اکولوژی میکروبی و نقش میکروبیوتایها را در زندگی جانوران مطالعه کردند.

فعالیت میکروبیوتایها در فیزیولوژی و رشد نقش مهمی دارد. شواهد نشان داده استفاده از پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان بیماری آتوپیک، اختلالات سیستم ایمنی، چاقی و دیابت موثر است (کلادو و همکاران، ۲۱۱۲). هدف از این پژوهش جداسازی باکتری‌های مفید دستگاه گوارش زنبور عسل در چند منطقه از استان مرکزی و بررسی شاخص‌های پروبیوتیکی جدایه‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های زنبور عسل کارگر سالم در تابستان، پاییز و اواخر زمستان ۱۳۹۳ از زنبورستان‌های استان مرکزی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با ایجاد شرایط مساعد هوارسانی به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی اراک انتقال داده شدند. دستگاه گوارش زنبور‌های عسل جداسازی جهت غنی‌سازی و رشد لاکتوباسیل‌ها به محیط MRS (مایع مرک آلمان) منتقل شدند. نمونه‌ها برای ۳ تا ۴ روز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد و در انکوباتور ۹٪ CO₂ در کشت داده شدند. ۹ کلنی با مورفولوژی متفاوت جداسازی، شناسایی و کشت ایزوله انجام شد. آزمون رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز به عنوان غربالگری اولیه لاکتوباسیل‌ها انجام شد. همچنین سویه‌های جداسازی شده جهت تست همولایز در محیط کشت MRS آگار حاوی ۰.۸٪ خون گوسفندی کشت داده شدند. باسیل‌های گرم مثبت

، کاتالاز منفی و همولایز منفی انتخاب شدند. نمونه های جدا شده جهت ذخیره سازی در MRS مایع ۲۱ درصد گلیسرول در دمای ۴°C (کشت و نگهداری شد) تاج آبادی و همکاران، ۲۰۱۳).

جهت بررسی توان پروبیوتیک جدایه ها تحمل شرایط اسیدی به مدت ۲ تا ۴ ساعت در محلول نرمال سالین حاوی HCl با pH ۲ و ۴ و سپس تهیه رقت های متوالی در دوسری شمارش انجام شد.

جهت سنجش تحمل جدایه های لاکتوباسیلی بدست آمده نسبت به صفر از محیط MRS مایع حاوی ۱/۳٪ نمک سدیم اگزالات استفاده و ضریب بازدارندگی در زمان صفر تا هشت ساعت محاسبه شد (مورلی و همکاران، ۲۰۱۱).

مطابق با پروتکل کیت استخراج DNA سیناکلون، DNA استخراج شد. ۲۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری را در میکروتیوب اضافه شده و برای ۹ دقیقه با دور ۴۱۱ rpm سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری ۱۱۱ میکرولیتر آنزیم پری لایزیز و ریبوتیناز اضافه و برای ۳۱ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس ۳۱۱ میکرولیتر بافر رسوب دهنده به میکروتیوب اضافه کرده و برای ۹ ثانیه ورتکس شدید انجام شد، نمونه حاضر ۱۳۱۱ rpm برای ۱ دقیقه سانتریفیوژ کرده و نمونه DNA استخراج شده مورد آزمون های بعدی قرار گرفت. در مطالعه حاضر از پرایمر اول (27F) (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') پرایمر دوم (1492R)

(5'GTTACCTTGTTACGACTT3') استفاده شد. واکنش های زنجیره ای پرایمری با PCR انجام شد و در نهایت محصول PCR مورد بررسی قرار گرفت و در ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با کیت تخلیص سازی و جهت تعیین توالی زنی S rRNA16 به شرکت بیونر کره جنوبی ارسال و سکانس ها با نرم افزار Finch TV و MEGA4 خوانده شدند.

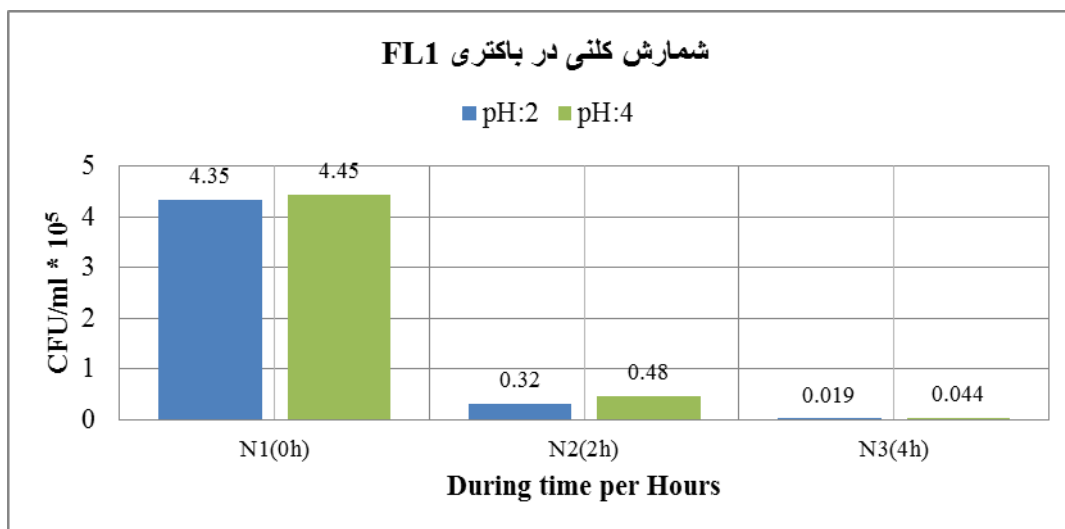
نتایج

از مجموع باکتریهای جداسازی شده یک باکتری باسیل کوتاه گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان لاکتوباسیل شناسایی و معرفی گردید. جهت تایید توان پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیل مورد بررسی تحمل اسید HCl با pH ۲ و ۴ قرار گرفت. شمارش دوسری نمونه باکتری در زمان صفر در pH ها به ترتیب دارای 35.4×10^5 cfu/ml و 45.4×10^5 cfu/ml بود. پس از گذشت ۲ ساعت مجدد شمارش باکتری در pH ها مورد بررسی قرار گرفت که دارای 32.0×10^5 cfu/ml و 48.0×10^5 cfu/ml بود، در نهایت شمارش باکتری در ۴ ساعت پس از تلقیح به ترتیب 019.0×10^5 cfu/ml و 044.0×10^5 cfu/ml بود. نتایج بیانگر آن است که باکتری شرایط اسیدی pH ۴ را در زمان ۲ ساعته میتواند تحمل کند و به حداقل استاندارد شمارش کلنی نزدیک باشد. همچنین باکتری جهت بررسی میزان تحمل نمک صفراوی در زمان صفر تا هشت ساعت در غلظت های ۱/۱۹٪، ۱/۳٪، ۱/۴۹٪ از نمک

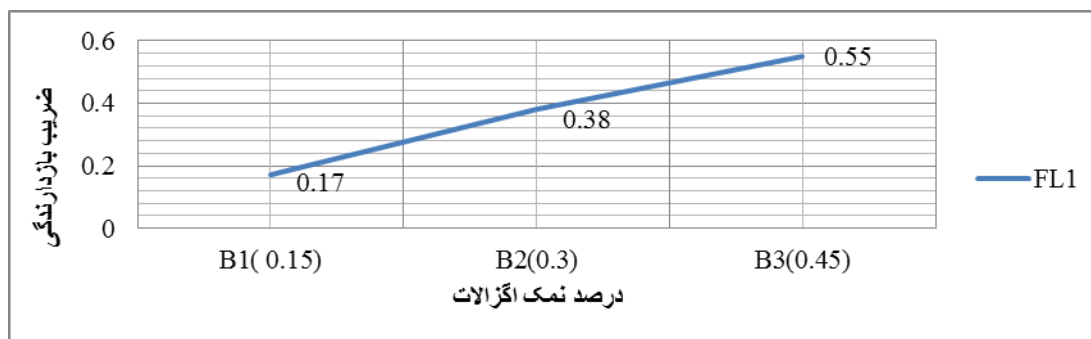
سدیم اگزالات با جذب نوری OD600 به ترتیب دارای شریب بازدارندگی ۱/۱۱، ۱/۳۸، ۱/۹۹ بود که شرایط بهینه برای باکتری های پروبیوتیک ضریب کمتر از ۱/۴ می باشد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که دستگاه گوارش زنبور عسل می تواند دارای ۱ فیلو تایپ مختلف از لاکتوباسیل باشد. باکتری با کد^۱FL_۱ (۹۸٪ مشابه لاکتوباسیلوس فارسیمینس بوده است که با نام های) Query-19897 (در دندروگرام فیلوژنتیکی تعریف گردید. نتایج حاصل از مطالعات نشان داد؛ در حال حاضر در معده زنبوران عسل در استان مرکزی باکتری هایی با جنس لاکتوباسیلوس قابل شناسایی است) نمودار^۳.

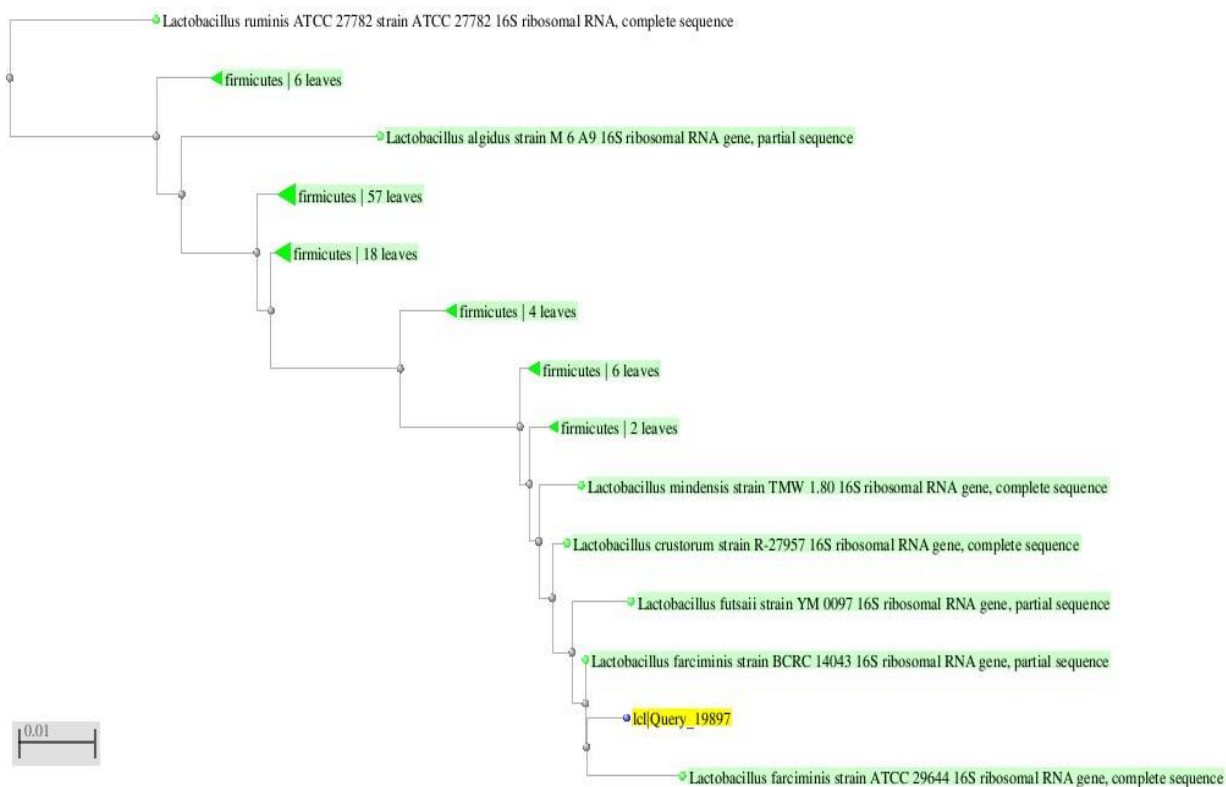
^۱ Farmahin-Lactobacillus



نمودار ۱- شمارش کلنی های مقاوم به اسید در بازه زمانی و تغییرات pH



نمودار ۲- تغییرات ضریب بازدارندگی نمک سدیم اغزالات در باکتری FL1



نمودار ۳- دندروگرام فیلوژنتیکی نمونه FL (Query_19897)

بحث و نتیجه گیری

مطالعات انجام شده بر جداسازی لاکتوباسیل های دستگاه گوارش زنبور عسل انجام گردید. باکتری های اسید لاکتیک شناسایی شده به عنوان باکتری های پروبیوتیک انسانی و حیوانی اهمیت دارند. بنابراین تحقیقات در مورد حضور غالب لاکتوباسیل ها در دستگاه گوارش زنبور عسل جهت بهبود ایمنی و سلامت زنبور و همچنین تولید محصول عسل حاوی پروبیوتیک حائز اهمیت است.

در مطالعه حاضر، تغییرات و شرایط آب و هوایی می تواند بر تنوع میکروارگانیسم های دستگاه گوارش حشرات از جمله زنبور عسل مؤثر باشد، هورانکوا و همکارانش در سال ۲۰۱۹ تنوع میکروبی روده زنبور عسل را با توجه به شرایط زمانی و جغرافیایی مورد مطالعه قرار دادند نتایج نشان داد میکروبیوتاهای جداسازی شده عمدتاً از گروه باکتری های گرم مثبت^۲ هستند که با نتایج آنالیز فیلوژنی

² Firmicute

در این تحقیق مشابه است) هورانکوا و همکاران، ۲۰۱۹). جوامع باکتریایی در زنبور عسل با توجه به گرده افشانی در گیاهان متفاوت است، همچنین ممکن است آلودگی هایی از این طریق به زنبور منتقل شود. باکتری های پاتوژن فرصت طلب در دستگاه گوارش زنبور عسل و گرده ها اسپنتوباکتر ها هستند، این باکتری در آب و خاک وجود دارد. گرشترین و همکارانش در سال ۲۰۱۳ جوامع باکتریایی را در زنبور عسل و گرده در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند، نتایج نشان داد ترکیبات جوامع باکتریایی در هر زنبور عسل منحصر به فرد است (گرشترین و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه حاضر، سویه های ایزوله شده از کیسه عسل زنبور ها با روش شناسایی 16S rRNA مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان داد، سویه جداسازی شده با روش رسم درخت فیلوژنتیکی از جنس لاکتوباسیلوس ها است، و ۹۸٪ به سویه لاکتوباسیلوس فارسیمینس شباهت دارد. کیلر و همکارانش در سال ۲۰۱۴، از دستگاه گوارش زنبور عسل در شرایط آزمایشگاهی لاکتوباسیلوس بومی^۲ را با شباهت ۸۱٪ به لاکتوباسیلوس آلیمنتاریوس DSM 20249 جداسازی کردند، که با نتایج جداسازی لاکتوباسیل ها در این تحقیق میتواند مشابه باشد (کیلر و همکاران، ۲۰۱۴). لاکتوباسیل ها طیف گسترده ای در زیستگاه ها و دستگاه گوارش حیوانات از جمله زنبور عسل دارند. وجود میکروارگانسیم های اسیدلاکتیک در عسل موجب پایین بودن pH و اثر ضد میکروبی آن می شود. تجزیه و تحلیل نشان داد که کیسه عسل زنبورهای عسل میتواند دارای فیلو تایپ مختلف از لاکتوباسیل ها باشد، تاج آبادی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ لاکتوباسیلوس پلانتاریوم،

لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس فرمنتوم را از کیسه عسل زنبور عسل در مالزی جداسازی و شناسایی کردند (تاج آبادی و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه حاضر، جدایه اسید لاکتیک از کیسه عسل مورد بررسی مقاومت و پایداری در شرایط اسیدی و نمک صفاوی قرار گرفت. از مجموع باکتری ها سویه لاکتوباسیلوس فارسیمینس نسبت به شرایط اسیدی نیمه حساس و نسبت به شرایط قلیایی نمک صفاوی پایدار بود. نریمانی و همکارانش در سال ۱۳۹۴ تحمل اسیدیته و مقاومت به نمک صفاوی را بر لاکتوباسیلوس های جدا شده از شیر در شهرستان خوی مورد بررسی قراردادند. نتایج نشان داد سویه های باکتریایی اسید لاکتیک در شرایط اسیدی (۲/۹، pH) دارای پایداری نیمه حساس تا مقاوم هستند. همچنین نمونه های غربالگری شده از شرایط اسیدی دارای مقاومت به نمک صفاوی (۱/۳٪) بودند. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد (نریمانی و همکاران، ۱۳۹۴).

عادت تغذیه یکی از قوی ترین عوامل مؤثر در فلور حشرات است. تفاوت در منبع شهد در جنس باکتریایی و فلور معده زنبور عسل تأثیر دارد. همچنین فعالیت زنبوران عسل در کندو می تواند در لاکتوباسیل ها و سویه های باکتریایی دستگاه گوارش آنها اثر داشته باشد (تاج آبادی و همکاران، ۲۰۱۱). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد لاکتوباسیلوس های جدید در دستگاه گوارش زنبور های

³ *Lactobacillus bombi*

عسل در استان مرکزی با فلوتایپ جدید و نزدیک به لاکتوباسیلوس فارسیمینس در گروهی از جنس لاکتوباسیل ها قرار گرفت که این تفاوت با بررسی 16SrRNA مورد مطالعه قرار گرفت . تقدیر و تشکر:

مولفین بر خود واجب می دانند تا از امکانات قرار گرفته توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد های قم و اراک برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

نریمانی، ط.، نژاد، ع. ت.، حجازی، م. (۱۳۹۴). جداسازی و شناسایی بیوشیمایی و مولکولی باکتری های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی از شیر گاو و ماست سنتی شهر خوی. علوم و صنایع غذایی، ۱۲، ۱۱۹-۱۲۸

ANDERSON, K. E., SHEEHAN, T. H., MOTT, B. M., MAES, P., SNYDER, L., SCHWAN, M. R., WALTON, A., JONES, B. M. & CORBY-HARRIS, V. 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (*Apis mellifera*).

CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L. & COLLINS, J. K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International journal of food microbiology*, 35, 1-27.

COLLADO, M. C., CERNADA, M., BAUERL, C., VENTO, M. & PEREZ-MARTÍNEZ, G. 2012. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut microbes*, 3, 352-563

GENERSCH, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 87-79

HRONCOVA, Z., HAVLIK, J., KILLER, J., DOSKOCIL, I., TYL, J., KAMLER, M., TITERA, D., HAKL, J., MRAZEK, J. & BUNESOVA, V. (2015). Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. *PloS one*, 10, e0118707.

KILLER, J., VOTAVOVA, A., VALTEROVA, I., VLKOVA, E., RADA, V. & HRONCOVA, Z. (2014). *Lactobacillus bombi* sp. nov., from the digestive tract of laboratoryreared bumblebee

queens (*Bombus terrestris*). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64, 2611-2617.

KOLLATH, W(1953). [The increase of the diseases of civilization and their prevention.]. *Munchener medizinische Wochenschrift* (1950), 95, 1260-1262.

LILLY, D. M. & STILLWELL, R. H(1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*, 147, 747-748.

MORELLI, L)2007(. In vitro assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. *International Dairy Journal*, 17, 1278-1283.

PATTABHIRAMAIAH, M., REDDY, M. & BRUECKNER, D. 2012. Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. *International Journal of Environmental Sciences*, 2, 1134-.3411

REUTER, G)1997(. Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe. *Bioscience and microflora*, 16, 43-51.

TAJABADI, N., MARDAN, M., MANAP, M. Y. A. & MUSTAFA, S)2013a(. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. Isolated from the honey comb of the honey bee (*apis dorsata*) by 16s rna gene sequencing. *Journal of Apicultural Research*, 52, 235-241.

TAJABADI, N., MARDAN, M., SAARI, N., MUSTAFA, S., BAHREINI, R. & MANAP, M. Y. A)2013b(. Identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus fermentum* from honey stomach of honeybee. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 717-.227

TAJABADI, N., MARDAN, M., MANAP, M. Y. A., SHUHAIMI, M., MEIMANDIPOUR, A. & NATEGHI, L)2011(. Detection and identification of *Lactobacillus* bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee *Apis dorsata*. *Apidologie*, 42, 642.946

Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal System of Honeybee in Markazi Province

Abstract:

Honeybee is a useful insect who plays a critical role due to pollination. Gastrointestinal system of honeybee has coexistent microorganisms. The recent researches showed that the useful microorganisms in honeybee are recognized to participate in the interactions of honeybee body. Using probiotic supplements in apiculture industry will increase the speed of growth, improve coefficient of food transformation, improve the resistance to disease and increase the honey production. The purpose of this research is to separate the useful bacteria of gastrointestinal system of honeybee in several districts of Markazi Province and study the probiotic indices of samples. Accordingly, the samples of healthy worker bees were separated from apiaries and carried to the laboratory for separation of gastrointestinal system. They were heated and enriched in MRS broth under anaerobic condition. Colonies of negative catalysis and hemolysis were analyzed by phylogenic diagnosis test. One lactobacillus was tested for the phylogenic identification which was *lactobacillus farciminis*. The results of this research indicated that presence of lactic acid bacteria in gastrointestinal system of honeybee.

Keywords: Honey bee, *Lactobacillus farciminis*, Probiotic