# جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از غذای سنتی ترخینه و بررسی توانایی آنها در کاهندگی سطح کلسترول و تری گلیسیرید در محیط آزمایشگاهی

**پروین افشار[a]، کیومرث امینی[b]*، حمید رضا مهاجرانی[c]، ساسان ساکی[d]**

[a] *دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران*

[b]* *استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.*

[c] *استادیار گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.*

[d] *استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۵/۱۸

https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.2.4.4 DOI:10.30495/JFTN.2022.67016.11201

## چکیده

**مقدمه:** جداسازی و شناسایی سویه‌های پروبیوتیک از غذاهای بومی می‌تواند منجر به یافتن سویه‌هایی با قابلیت‌های منحصر به فرد شود. این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی توانایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداسازی شده از غذای سنتی ترخینه در کاهندگی سطح کلسترول و تری گلیسیرید در محیط آزمایشگاهی انجام شده است.

**مواد و روش‌ها:** سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از غذای محلی به نام ترخینه با استفاده از محیط‌کشت جداسازی شده و براساس ویژگی‌های فنوتیپی، آزمون‌های بیوشیمیایی استاندارد و بررسی توالی 16SrRNA شناسایی گردیدند. در مرحله بعد سویه‌ها از نظر خصوصیات پروبیوتیکی همچون مقاومت به اسید و صفرا و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین فعالیت کاهش کلسترول و تری گلیسیرید محیط‌کشت آنها به روش فتال دی آلدئید بررسی گردید.

**یافته‌ها:** بررسی‌ها نشان داد که از نمونه‌های ترخینه۱۶ سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداسازی شدند که از بین آنها در شرایط اسیدی چهار سویه (S3, S5, S6, S12) دارای ۳۰ تا ۵۰ درصد بقا، ۳ سویه (S4, S7, S10) دارای ۵۰ تا ۷۵ درصد بقا و ۲ سویه (S1, S11) دارای ۷۵ تا ۱۰۰ بقا بودند. علاوه براین سویه‌های S7 و S1 در میزان بایل۰/۳ تا ۰/۵ درصد رشد نشان دادند و سویه‌های S4, S3, S11 در شرایط ۰/۷ درصد نمک صفراوی در محیط‌کشت MRS رشد نمودند. بیشترین جذب کلسترول در سویه‌های S11 و S1 به میزان ۰/۲۳ ± ۶۴ و ۰/۱۸± ۶۰ درصد مشاهده شد ($p<0.01$). سویه‌های S1 و S11 به ترتیب ۰/۶۴± ۷۲ درصد، ۰/۲۵± ۶۱ درصد میزان کاهش تری گلیسیرید را اعمال نمودند.

**نتیجه‌گیری:** داده‌های این مطالعه نشان داد که سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداسازی شده از غذای محلی ترخینه دارای پتانسیل جذب و کاهش کلسترول و تری گلیسیرید محیط‌کشت بوده‌اند. این سویه‌ها می‌توانند به عنوان پروبیوتیک‌های دارای توانایی جذب و حذف چربی، مورد مطالعه بر روی حیوانات آزمایشگاهی قرار گیرند.

***واژه‌های کلیدی:*** *پروبیوتیک، ترخینه، کلسترول، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: dr_kumarss_amini@yahoo.com

## مقدمه

آمار نشان می‌دهد که بیماری قلبی – عروقی نخستین علت مرگ و میر در ایران و در جهان به شمار می‌رود به طوری که تقریباً ۴۰ درصد فوت جوانان در ایران به دلیل بیماری‌های قلبی – عروقی است. مطالعات اثبات نموده‌اند که الگوهای نامناسب غذایی به طرز چشمگیری در افزایش این روند تاثیر دارد (Benjamin *et al*., 2019). افزایش چربی خون از مهمترین عوامل ایجاد کننده بیماری‌های قلبی و عروقی است و در این بین افزایش کلسترول و تری گلیسرید می‌تواند منجر به تشدید بیماری در افراد شود. مطالعات نشان داده‌اند که کاهش یک درصد از کلسترول خون می‌تواند منجر به کاهش ۳ درصدی بروز بیماری‌های قلبی و عروقی شود.

غذاهای فرا سودمند دسته‌ای از غذاهای عملکردی هستند که به منظور افزایش کیفیت زندگی جوامع انسانی استفاده می‌شوند و مهمترین عملکرد آنها در اثر تغییر در جمعیت باکتری‌های روده رخ می‌دهد. این دسته غذایی علاوه بر خواص تغذیه‌ای متعارف دارای ویژگی‌هایی هستند که در اثر افزوده شدن ویتامین‌ها، باکتری‌های پروبیوتیک یا سایر عوامل سودمند به دست می‌آیند و می‌توانند در کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن تاثیر گذار شوند (Granato *et al*., 2020). باکتری‌های پروبیوتیک از مهمترین اجزای تشکیل دهنده غذاهای فراسودمند هستند و در مطالعات متعدد اثر آنها در زمینه تولید مولکول‌های پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، ،بهبود علایم نشانگان روده تحریک پذیر و کولیت، رفع مشکلات گوارشی، کاهش کلسترول خون و میزان جذب آنها از روده، کاهش شانس ابتلا به سرطان‌های روده، کبد و پستان و کاهش بیماری‌زایی باکتری‌های مضر گزارش شده است (Aguilar-Toalá *et al*., 2018).امروزه اثبات شده است که سویه‌های بومی مناطق مختلف جهان می‌توانند مزیت‌ها و فواید مختلفی را از خود بروز دهند. بنابراین دانشمندان همواره به دنبال کشف سویه‌های پروبیوتیک بومی هستند (Birch & Bonwick, 2019; El-Saadony *et al*., 2021). در بین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک ساکارومایسس، استرپتوکوکوس، انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس، *اشرشیاکلی* و بیفیدوباکتری‌ها دارای اهمیت فراوانی هستند چرا که علاوه بر مقاومت در مقابل شرایط گوارشی دارای چسبندگی بالا به مخاط روده نیز میباشند. در مطالعات اخیر داده‌ها نشان داده است که برخی از پروبیوتیک‌ها دارای خاصیت جذب کلسترول و چربی‌های خون هستند (Kerry *et al*., 2018). تاکنون مکانیسم‌های مولکولی دقیق کاهش چربی خون توسط سویه‌های پروبیوتیک مشخص نگردیده‌اند اما اعتقاد بر این است که جذب چربی‌ها و تبدیل یا تجزیه آن توسط آنزیم‌های اکسیداز در باکتری‌ها صورت می‌گیرد. همچنین اثبات گردیده است که چربی محیط می‌تواند با اتصال به پوشش سلولی باکتری و ادغام در لایه دوگانه فسفولیپیدی غشایی سویه‌های پروبیوتیک جذب شود (Ma *et al*., 2019; Sivamaruthi *et al*., 2019). جداسازی و شناسایی باکتریهای پروبیوتیک موجود در مواد غذایی از مهمترین زمینه‌های تولید محصولات پروبیوتیک بوده است. مدت‌ها قبل از آگاهی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، محصولات تخمیری مانند آبجو، نان، شراب، کفیر، کومیس و پنیر اغلب برای اهداف تغذیه‌ای و درمانی استفاده می‌شدند. باور عمومی بر این است که محصولات تخمیر شده احتمالاً خود به خود کشف شده اند. این افسانه می‌گوید که ماست به احتمال زیاد نتیجه یک فرآیند تخمیر در کیسه‌های پوست حیوانات است که برای حمل و نقل آب و شیر در مناطق با رطوبت کم و دمای بالا (آسیای میانه و خاورمیانه) استفاده می‌شود. تاریخچه پروبیوتیک‌ها به موازات تکامل نژاد بشر پیش می‌رود و به لطف تکنیک‌های پیچیده در حال حاضر، می‌توان آن را به دوران باستان، نزدیک به ۱۰۰۰۰ سال پیش ردیابی کرد (Aguilar-Toalá *et al*., 2018).

ترخینه نوعی غذای تخمیری است که از دوغ یا شیر تخمیر شده به دست می‌آید و در کشورهای آسیای مرکزی و خاورمیانه به خصوص در ایران، ارمنستان و سوریه مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به این که شناسایی پروبیوتیک‌های جدید دارای پتانسیل‌های سودمند برای انسان از اهمیت فراوانی برخوردار است، این مطالعه بر آن بوده است تا علاوه بر جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از غذای محلی ترخینه در استان لرستان در مرکز ایران، به بررسی تاثیر آن بر سطح لیپیدها در محیط کشت بپردازد.

## مواد و روش‌ها

### - جداسازی و شناسایی سویه‌ها

در این مطالعه جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از غذای محلی ترخینه انجام گردید که نوعی افزودنی در تهیه سوپ در نواحی کوهستانی غرب ایران است. در این تحقیق تعداد ۳۰ نمونه ترخینه از منطقه الیگودرز لرستان جمع آوری گردید و پس آسیاب شدن و کد گذاری در دمای ۴ درجه نگهداری شد.

جداسازی سویه‌های پروبیوتیک با کشت نمونه‌ها در محیط‌کشت مایع De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (HiMedia, India) در شرایط میکروآئروفیل و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انجام شد. پس از بررسی رشد سویه‌ها، از کلنی‌های رشد یافته روی محیط مذکور که شکل ظاهری آنها به صورت صاف، براق و دارای حاشیه کامل بود، به کمک لوپ کشت استریل نمونه‌برداری شد و رنگ‌آمیزی گرم بر روی آن صورت گرفت. در مرحله بعد تست‌های بیوشیمیایی همچون تست IMViC، احیای سیترات، کاتالاز و اکسیداز، تولید گاز، هیدرولیز ژلاتین، حرکت و احیای نیترات قرار گرفتند. سپس توانایی سویه‌ها در تخمیر کربوهیدرات‌های آمیگدالین، مانیتول، رامنوز سلوبیوز، اسکولین، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، آرابینوز، گلوکونات و ریبوز مورد بررسی قرار گرفت (Izadi *et al*., 2010).

### - شناسایی مولکولی

سویه‌های مشکوک به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به منظور شناسایی دقیق‌تر مورد بررسی توالی ژن 16S rRNA قرار گرفتند. ابتدا ژنوم سویه‌ها توسط کیت استخراج DNA اختصاصی باکتری (GenElute, Sigma) استخراج گردید. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری (Nanodrop, ThermoScientific) و الکتروفورز در ژل آگاروز ۲ درصد تایید گردید. تکثیر توالی 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PIB16 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3`5 و MIB16Ā(5´GGCTGCTGGCACGTAGTTAG3) انجام گرفت (Izadi *et al*., 2010). برای هر واکنش PCRمیزان ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon, USA)، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمرها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر مورد نیاز بود. مراحل دمایی واکنش PCR شامل مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در حضور کنترل منفی در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند و پس از رنگ‌آمیزی با اریتروژل توسط دستگاه ژل داک (Maham Azma, Iran) از آنها عکس‌برداری گردید. نهایتا محصولات PCR توسط شرکت Bioneer Inc. (South Korea) توالی یابی گردیدند. همسانی توالی پس از مقایسه توالی سویه با آنهایی که در پایگاه داده (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) تعیین شد. درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA6 به روش Neighbor-joining انجام گردید.

### - بررسی میزان تحمل شرایط گوارشی در سویه‌ها

به منظور بررسی مقاومت سویه‌های جداسازی شده به شرایط دستگاه گوارش، میزان تحمل آنها به اسید و نمک‌های صفراوی بررسی گردید. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت نیم مک فارلند سوسپانسیون میکروبی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط‌کشت MRS با pH=2.0 و لوله کنترل حاوی محیط‌کشت MRS با pH=7.0 اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه انکوبه شد. سپس یک میلی لیتر از هر لوله در محیط کشت MRS آگار تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط میکروآئروفیل انکوبه گردید. سپس شمارش میکروارگانیسم‌ها طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۹۸۹۹ انجام شد. در مرحله بعد سویه‌های مقاوم به شرایط اسیدی وارد آزمون بررسی مقاومت به نمک‌های صفراوی گردیدند. در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت نیم مک فارلند سوسپانسیون میکروبی به ۱۰ میلی لیتر محیط‌کشت MRS مایع به عنوان کنترل و محیط‌کشت

MRS حاوی ۰,۳ تا ۰,۷ درصد بایل (Oxgall)اضافه شد. جذب نوری محیط‌ها قبل از انکوباسیون و در فواصل نیم ساعته به مدت ۸ ساعت پس از انکوباسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان مقاومت باکتری‌ها از فرمول ضریب بازدارندگی محاسبه شد.

Coefficient of Inhibition (Cinh) = ΔT8-T0 Control – ΔT8 - T0 Treatment / ΔT8 - T0 Control.

در این فرمول T8 - T0Δ عبارت از اختلاف جذب نوری نمونه‌ها در زمان صفر و۸ ساعت بعد از انکوباسیون است. همچنین ضریب بازدارندگی مساوی یا کمتر از ۰,۴ نشان دهنده مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی در نظر گرفته می‌شود.

**- بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها**

در این مرحله از روش انتشار دیسک برای سنجش تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم) ، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و پنی سیلین G (۱۰ میکروگرم) بر روی سویه‌های جداسازی شده استفاده گردید. سویه‌ها به محیط کشت MRS آگار تلقیح گردیدند و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با استفاده از پنس استریل در پلیت‌های تلقیح شده قرار داده شده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه هاله بازدارندگی سنجیده شد و باکتری‌های مورد مطالعه بر اساس جدول CLSI به گروه‌های مقاوم، متوسط و حساس دسته بندی گردیدند (Mayrhofer *et al*., 2008).

**- بررسی حذف کلسترول و تری‌گلیسیرید محیط‌کشت**

در این مرحله توانایی بالقوه حذف کلسترول و تری گلیسیرید در سویه‌های مقاوم به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی مورد سنجش قرار گرفت. به منظور بررسی میزان کلسترول ابتدا ۰/۲ میکرولیتر از غلظت نیم مک فارلند سوسپانسیون میکروبی سلول به ۲۰ میلی لیتر محیط‌کشت MRS حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلسترول اگزالات تلقیح گردیده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. از محیط‌کشت حاوی کلسترول اگزالات بدون تلقیح میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان بلانک استفاده گردید. پس از طی دوره انکوباسیون لوله‌ها در دمای اتاق به مدت ۴ دقیقه در ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و نیم میلی لیتر از سوپرناتانت به لوله شیشه‌ای منتقل شد. سپس ۲ میلی لیتر هیدروکسید پتاسیم ۵۰ درصد و ۳ میلی لیتر از اتانول ۹۵ درصد (مرک، آلمان) به آن افزوده شده و با ورتکس به مدت یک دقیقه مخلوط گردید و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. در مرحله بعدی، ۵ میلی لیتر هگزان و ۳ میلی لیتر آب مقطر به هر لوله افزوده شد و پس از مخلوط شدن تا زمانی که آب و فاز ارگانیک کاملا از یکدیگر جدا شوند (تقریبا ۱۵ دقیقه) در دمای اتاق باقی ماندند. سپس ۲/۵ میلی لیتر از لایه رویی حاوی هگزانبه لوله دیگری انتقال یافته و در حمام آب ۶۵ درجه قرار گرفت تا هگزان تبخیر شود. نهایتا ۴ میلی لیتر فتال دی آلدئید به مایع باقی مانده در لوله اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون با ۲ میلی لیتر سولفوریک اسید مخلوط گردید و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Shemshad *et al*., 2021). بررسی اثر کاهندگی تری گلیسیرید در سویه‌هایی صورت گرفت که به میزان قابل قبولی سطح کلسترول محیط (بیش از ۳۰ درصد) را کاهش میدادند. پس از کشت سویه‌ها در محیط کشت MRS مایع حاوی ۳ درصد تری گلیسیرید، آنها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند سپس میزان تری گلیسیرید سوپرناتانت بدون سلول با استفاده از کیت تری گلیسیرید در 500 nm اندازه‌گیری گردید.

**- تجزیه و تحلیل آماری**

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از مطالعه با استفاده از SSPSS ver.18 انجام گرفت. برای افزایش معنی‌داری گروه‌های مورد مقایسه از آزمون Post Hoc Tukey استفاده شد که نشانگر بیشترین معنی‌داری است. میزان $p<0.05$ ارتباط آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

**- جداسازی و شناسایی سویه‌ها**

در این مطالعه ۴۲ نمونه ترخینه جمع‌آوری شده از ۲۸ روستای شهرستان الیگودرز در استان لرستان مورد بررسی

قرار گرفتند و ۱۸۵ سویه باکتری و مخمر از این نمونه‌ها جداسازی گردید. پس از بررسی‌های بیوشیمیایی ۱۶ سویه گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز و IMViC منفی و MR-VP منفی جداسازی شدند که الگوی تست کربوهیدرات آنها نشان می‌داد دارای توانایی تخمیر قندهای آمیگدالین، آرابینوز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز و مانوز اما ناتوان از تخمیر قندهای ریبوز، مانیتول بودند. این سویه‌ها از شماره S1 تا S16 شماره گذاری گردیدند و مورد بررسی‌های بیشتر مولکولی قرار گرفتند. بررسی توالی یابی 16S rRNA نشان داد که تمامی سویه‌ها دارای تشابه ژنتیکی بیش از ۹۰ درصد با باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بوده‌اند (شکل ۱).

- **مقاومت به اسید و صفرا**

یکی از خصوصیات قابل توجه باکتری‌های پروبیوتیک تحمل اسیدیته معده و قابلیت عبور از آن است. غربالگری سویه‌های جداسازی شده در محیط با pH اسیدی در مدت زمان ۲ ساعت نشان داد که ۹ سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوساز نمونه‌های ترخینه جداسازی شده است که در درصدهای مختلف مقاومت به اسید را نشان داده اند. نتایج نشان داد که چهار سویه (S3, S5, S6, S12) دارای ۳۰ تا ۵۰ درصد بقا، ۳ سویه (S4, S7, S10) دارای ۵۰ تا ۷۵ درصد بقا و ۲ سویه (S11, S1) دارای ۷۵ تا ۱۰۰ بقا بودند. سایر سویه‌ها در ۲ ساعت اول کشت نسبت به محیط اسیدی حساسیت نشان دادند.در مرحله بعد ایزوله‌های جداسازی شده مقاوم به شرایط اسیدی، در شرایط نمک‌های صفراوی قرار داده شدند. داده‌ها نشان داد که سویه‌های S5, S10, S12 و S6 نسبت به مقادیر Oxgall ۰/۳ درصد مقاوم بودند در حالی که سویه‌های S7 و S1در میزان بایل ۳۰/ تا ۰/۵ درصد رشد نشان دادند. علاوه بر این تعدادی از سویه‌ها (S3, S4, S11) در شرایط ۰/۷ درصد نمک صفراوی در محیط‌کشت MRS رشد نشان دادند.

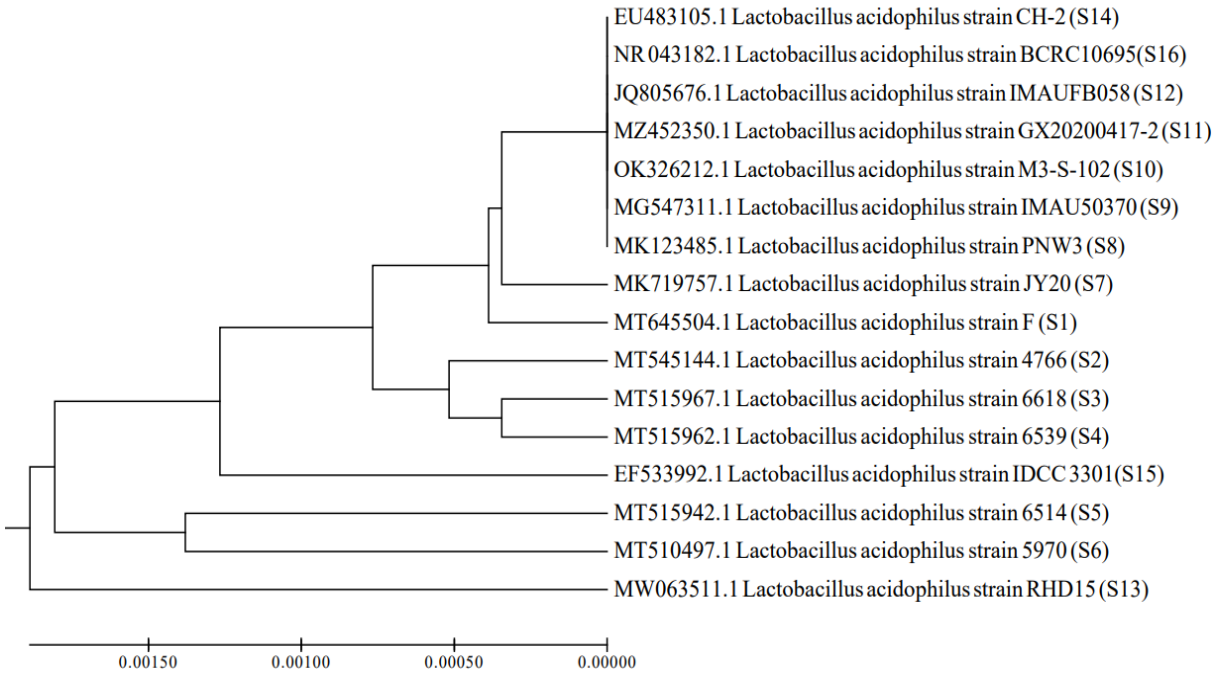


**Figure 1– Estimation of phylogenetic relationship between 16 strains isolated from local Tarkhineh food was determined using UPGMA method with 1000 bootstrap replications.The replacement model was the maximum likelihood.**

**شکل ۱- تخمین ارتباط فیلوژنیک بین ۱۶ سویه جداسازی شده از غذای محلی ترخینه با استفاده از روش UPGMA با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ تعیین شد. مدل جایگزینی حداکثر احتمال ترکیبی بود.**

**- بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها**

در این مطالعه از نمونه‌های ترخینه ۹ سویه شناسایی شده به‌عنوان باکتری هایپروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مقاوم به شرایط گوارشی مورد بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ذیل نشان داده شده است. داده‌ها نشان داد که سویه S7 به کانامایسین، سویه‌های S10 و S5 به پنی‌سیلین، و سویه S12 به تتراسایکلین مقاومت نشان داده اند در حالی که در سایر موارد حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشته است.

**- پتانسیل حذف کلسترول محیط کشت**

پتانسیل حذف کلسترول از محیط کشت در ۹سویه مقاوم به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی بررسی گردید و نتایج نشان داد که سویه‌های S11 و S1 به ترتیب میزان کلسترول را در محیط‌کشت به میزان ۰/۲۳±۶۴ و نیز ۰/۲۳±۶۴ درصد کاهش دادند ($p<0.01$). همچنین سویه‌های S7, S10, S12 به ترتیب موجب کاهش کلسترول محیط کشت به میزان ۰/۵۵±۳۸، ۰/۸۷±۳۳ و ۰/۳۵±۴۵ درصد شدند. سایر سویه‌ها منجر به کاهش کلسترول به میزان کمتر از ۲۰ درصد شدند.

**جدول ۱ - حساسیت ایزوله های جداسازی شده در برابر آنتی بیوتیک های رایج با استفاده از روش انتشار دیسک**

**Table 1- Susceptibility pattern of isolated strains against common antibiotics using disc diffusion method**

| Number of the isolate | Kanamycin | Tetracycline | Erythromycin | Penicillin | Chloramphenicol | Vancomycin |
|---|---|---|---|---|---|---|
| S1 | S | S | S | S | S | S |
| S3 | S | S | S | S | S | S |
| S4 | I | S | S | S | S | S |
| S5 | S | I | S | R | S | S |
| S6 | S | S | S | S | S | S |
| S7 | R | S | S | S | S | S |
| S10 | S | S | S | R | S | S |
| S11 | S | S | S | S | S | S |
| S12 | S | R | S | S | S | S |



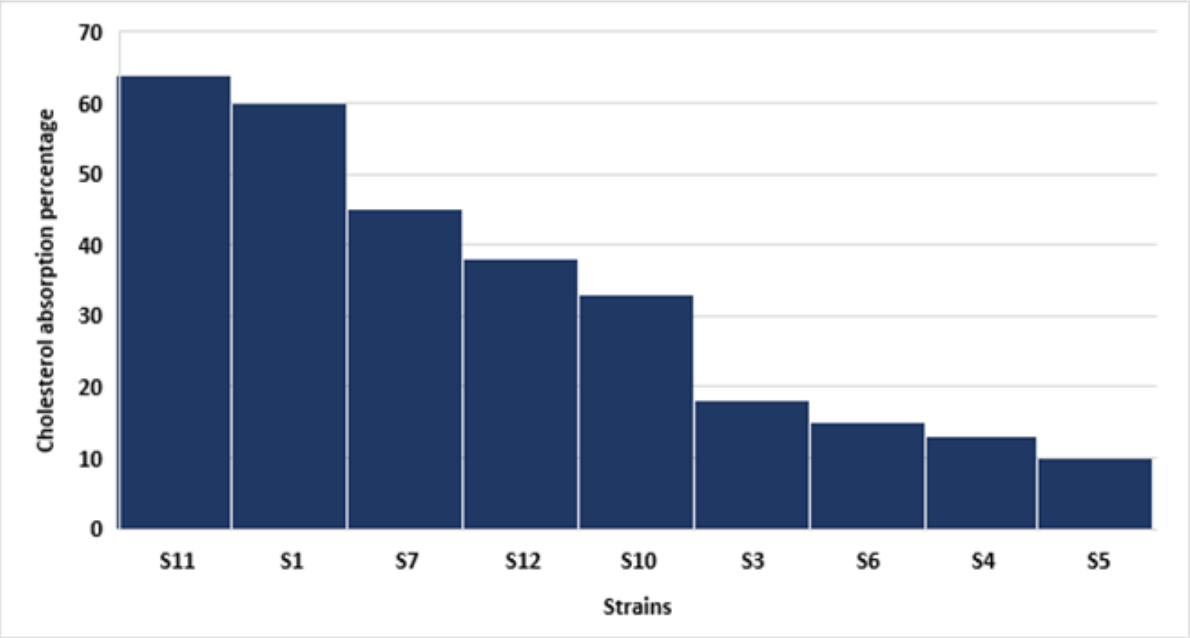


**Figure 2– Percentage of cholesterol uptake after incubation period in strains isolated from local Tarkhineh food. Each column represents the average of 3 independent tests.**

**شکل ۲- درصد جذب کلسترول پس از طی دوره انکوباسیون در سویه های جداسازی شده از ترخینه.**

هر ستون نشان دهنده میانگین ۳ آزمون مستقل است.

- **پتانسیل حذف تری گلیسیرید محیط کشت**

در بین سویه‌های مقاوم به شرایط گوارشی که حساس به آنتی بیوتیک‌های رایج بودند، سویهS1 و S11 به ترتیب ۷۲±۰/۶۴ درصد، ۶۱ ±۰/۲۵درصدمیزان کاهش تری گلیسیرید را اعمال نمودند. همچنین سویه‌های S7 و S3 به ترتیب ۵۵ درصد و ۴۲ درصد کاهش میزان تری گلیسیرید را نشان دادند در حالی که در سایر سویه‌ها میزان کاهش تری گلیسیرید کمتر از ۳۰ درصد بود.

## بحث

امروزه با افزایش آگاهی عمومی، استفاده از غذاهای فراسودمند افزایش قابل توجهی یافته است. سویه‌های پروبیوتیک موجود در مواد غذایی تخمیری از مهمترین اجزای تشکیل دهنده غذاهای فراسودمند هستند که میتوانند در مبارزه با بیماری‌های مختلف انسانی مورد توجه قرار گیرند. همچنین تاکنون در مطالعات مختلف اثر کاهندگی چربی توسط پروبیوتیک‌ها بررسی شده است (Bhat & Bajaj, 2020). سویه‌های پروبیوتیکبه عنوان میکروارگانیسم‌های زنده غیر بیماری زا اثرات سلامت بخش زیادی از جمله، نقش درتعدیل فاکتورهای لیپیدی از جمله لیپوپروتئین با دانسیته بالا و پایین، کلسترول تام و تری گلیسیرید دارند. داده‌های حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که برخی سویه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا سازی شده از غذای بومی ترخینه دارای خواص کاهندگی کلسترول و تری گلیسیرید محیط کشت به میزان بیش از ۶۰ درصد بوده‌اند.

در بررسی مطالعات بر روی محصولات لبنی مشخص گردید که اثرات کاهندگی لیپید در سویه‌های پروبیوتیک در مطالعات مختلف اثبات گردیده است. مطالعه حاضر اطلاعات دیگری را در تایید پتانسیل سویه‌های *لاکتوباسیلوس لاکتوکوکوس* بومی ایران به منظور استفاده در غذاهای فرا سودمند ارائه می‌نماید. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ محمدی و همکاران به بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از مدفوع حیوانی بر کاهش غلظت کلسترول در شرایط آزمایشگاهی در محیط‌کشت مایع MRS پرداختند. بر اساس داده‌های آنها باکتری‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه‌های مدفوع گاو تغییری در میزان کلسترول موجود در محیط‌کشت ایجاد نکردند. در میزان کلسترول موجود در محیط‌کشت ایجاد نکردند. در حالی که برخی از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از مدفوع



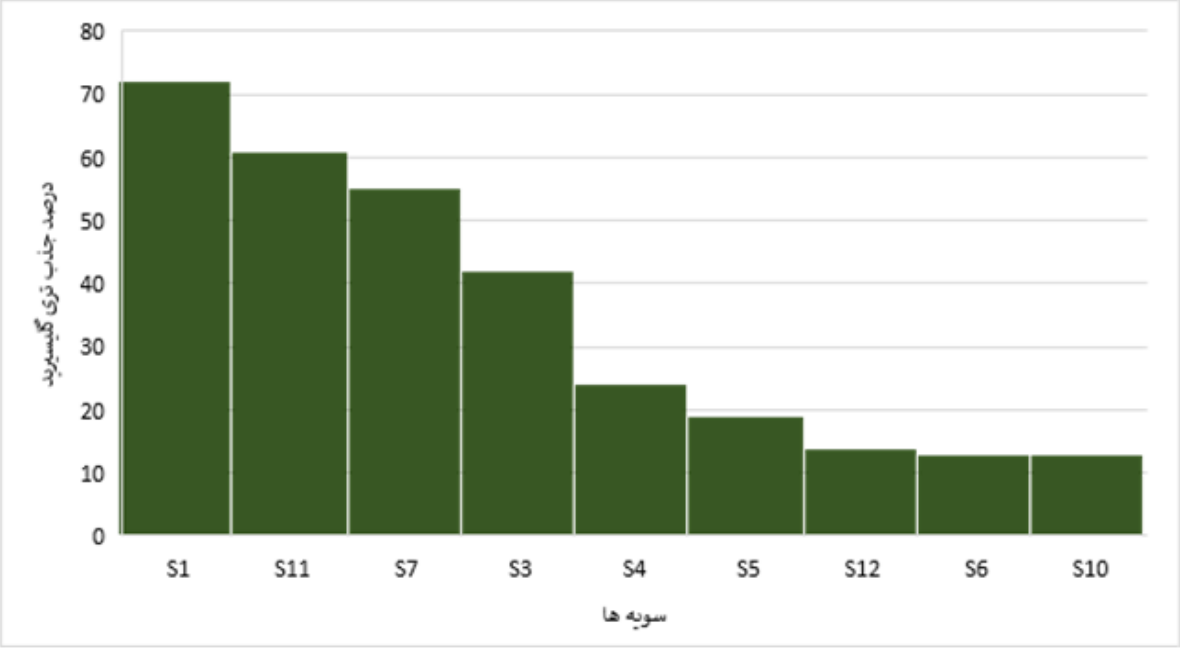


**Figure 3- Percentage of culture medium triglyceride uptake in strains isolated from Tarkhineh local food.**
Each column represents the mean±standard deviation of 3 independent tests.

**شکل ۳- درصد جذب تری گلیسیرید محیط کشت پس از طی دوره انکوباسیون در سویه های جداسازی شده از ترخینه.**
هر ستون نشان دهنده میانگین ±انحراف معیار ۳ آزمون مستقل است.

گاومیش توانستند مقدار کلسترول موجود در محیط کشت را پس از ۲۴ ساعت کاهش دهند. داده‌های آنها نشان داد که بیشترین کاهش در کلسترول محیط‌کشت مربوط به *لاکتوباسیلوسپاراکازئی* (۵۰ ٪کاهش) و کمترین آن مربوط به *لاکتوباسیلوسکازئی* (۱۲ ٪) بوده است (Mohammadi &Tukmechi, 2018). در مطالعه حاضر سویه‌های S11 و S1 به ترتیب میزان کلسترول را در محیط کشت به میزان ۰/۲۳ ± ۶۴ و ۰/۱۸ ± ۶۰ درصدکاهش دادند ($p<0.01$) که به طرز قابل توجهی بالاتر از مطالعه مذکور بوده است. Ejtehad و همکاران در مطالعه دیگری به بررسی اثر ماست پروبیوتیک حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم لاکتیس* بر سطح سرمی چربی‌ها در بیماران دچار دیابت تیپ ۲ پرداختند. داده‌های آنها نشان داد که مصرف ۶ هفته ای ماست پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل (که ماست غیر پروبیوتیک را مصرف نموده بودند) موجب کاهش ۴٫۵ درصدی کلسترول تام و ۷٫۴۵ درصدی LDL شده است (Ejtahed *et al*., 2011). مطالعه دیگری توسط Rerksuppaphol و همکاران نشان داد که میزان کلسترول در گروه مصرف کننده محصولات پروبیوتیک کاهش میابد (Rerksuppaphol & Rerksuppaphol, 2015). اما داده‌های هر دو مطالعه نشان داد که این سویه‌ها تاثیر بر میزان تری گلیسرید و HDL نداشته‌اند. این در حالی است که سویه‌های جداسازی شده در مطالعه حاضر دارای پتانسیل کاهش تری گلیسرید نیز بوده‌اند. مطالعه حاضر در توافق با مطالعات ذکر شده نشان داد که جداسازی سویه‌های بومی دارای پتانسیل جذب و کاهش کلسترول و تری گلیسرید می‌تواند قدمی اولیه در جهت کشف سویه‌های پروبیوتیک موثر بر هایپر لیپیدمی و هایپر کلسترولمی باشد. یک مطالعه سیستماتیک همسو با یافته‌های این تحقیق در سال ۲۰۲۰ نشان داده است که غذای پروبیوتیک می‌تواند منجر به کاهش قابل توجه میزان کلسترول در افراد هایپر کلسترولمیک شود اما این عملکرد وابسته به پتانسیل سویه پروبیوتیک است (Pourrajab *et al*., 2020). داده‌های مطالعه حاضر نشان داد که علیرغم حساسیت اکثر سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها، همچنان در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت وجود دارد که می‌تواند به باکتری‌های دیگر منتقل شود از این رو این داده‌ها در تطابق با یافته‌های قبلی بر دقت در انتخاب باکتری پروبیوتیک تاکید می‌نماید (Kim و Nami .(*et al*., 2020; Majeed *et al*., 2019 همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که سویه‌های *لاکتوباسیل پلانتاروم* جدیدی از ماست محلی در ایران جداسازی شده است که دارای پتانسیل کاهش کلسترول به میزان ۸۴ درصد در سلول‌های زنده و ۳۲ درصد در سلول‌های مرده بوده است. علاوه بر این، *لاکتوباسیل پلانتاروم YS5* هیچ گونه عوارض جانبی مانند فعالیت همولیتیک، فعالیتBSH و مقاومت آنتی بیوتیکی را نشان نداد. یافته‌های این کار نشان داد که *L. plantarum YS5* ممکن است یک کاندید پروبیوتیک امیدوار کننده برای کاربرد در صنایع غذایی برای تولید محصولات کم کلسترول که دارای فعالیت کاهندگی کلسترول در میزبان هستند باشد (Nami *et al*., 2019). این یافته‌ها در راستای یافته‌های حاضر بر حساس بودن سویه‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک‌های رایج تاکید دارد.

## نتیجه‌گیری

در پی استراتژی غربالگری سیستماتیک آزمایشگاهی در این مطالعه مشخص گردید که سویه‌های جداسازی شده از غذای محلی ترخینه در محیط‌کشت MRS دارای پتانسیل کاهش کلسترول و تری گلیسرید به صورت قابل توجه بوده اند. همچنین، بررسی‌های بیشتر بر روی سویه‌های دارای خواص جذب لیپیدها نشان داد که آنها نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی مقاومت داشته‌اند و همچنین حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها در اغلب سویه‌ها دیده شده است که نشان می‌دهد این سویه‌ها می‌توانند مورد بررسی در حیوانات قرار گیرند تا پتانسیل سلامت زای آنها روشن شده و قدمی در جهت استفاده از آنها در صنعت غذایی برداشته شود.

## منابع

Aguilar-Toalá, J., Garcia-Varela, R., Garcia, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B. & Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, *75*, 105-114 .

Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S. & Das, S. R. (2019). Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, *139*(10), e56-e528 .

Bhat, B. & Bajaj, B. K. (2020). Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. *3 Biotech*, *10*(5), 1-16 .

Birch, C. S. & Bonwick, G. A. (2019). Ensuring the future of functional foods. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(5), 1467-1485 .

Ejtahed, H., Mohtadi-Nia, J., Homayouni-Rad, A., Niafar, M., Asghari-Jafarabadi, M., Mofid, V. & Akbarian-Moghari, A. (2011). Effect of probiotic yogurt containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of dairy science*, *94*(7), 3288-3294 .

El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A., Dhama, K. & Abdel-Latif, H. M. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: an overview. *Fish & Shellfish Immunology*, *117*, 36-52 .

Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G. & Putnik, P. (2020). Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. *Annual Review of Food Science and Technology*, *11*, 93-118 .

Izadi, M., Fooladi, M. H., SHarifi Sirchi, G. & Amini, J. (2010). Isolation of Lactobacillus acidophilus from Sharbabk city yoghurt and its molecular characterization. *Agricultural Biotechnology Journal*, *2*(2), 1-12 .

Kerry, R. G., Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.S. & Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. *Journal offood and drug analysis*, *26*(3), 927-939 .

Kim, E., Chang, H. C. & Kim, H.Y. (2020). Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum EM, a putative probiotic strain with the cholesterol-lowering effect and antimicrobial activity. *Current Microbiology, 77(8) 1871-1882*.

Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X. & Lv, J. (2019). Screening for cholesterol-lowering probiotics from lactic acid bacteria isolated from corn silage based on three hypothesized pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(9), 2073 .

Mayrhofer, S., Domig, K. J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G. & Kneifel, W. (2008). Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of Lactobacillus acidophilus group members. Applied and Environmental Microbiology, 74(12), 3745-3748.

Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K. & Ali, F. (2019). Evaluation of the in vitro cholesterol-lowering activity of the probiotic strain Bacillus coagulans MTCC 5856. *International Journal of Food Science & Technology*, *54*(1), 212-220 .

Mohammadi, H. & Tukmechi, A. (2018). A. In vitro evaluation of cholesterol lowering effects of isolated Lactobacillus probiotics from cattle and buffalo feces, Journal of veterinaty microbiology, 37(8), 31. [In persian]

Nami, Y., Bakhshayesh, R. V., Manafi, M. & Hejazi, M. A. (2019). Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic Lactobacillus plantarum YS5 isolated from yogurt. *LWT*, *111*, 876-882 .

Pourrajab, B., Fatahi, S., Dehnad, A., Varkaneh, H. K. & Shidfar, F. (2020). The impact of probiotic yogurt consumption on lipid profiles in subjects with mild to moderate hypercholesterolemia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, *30*(1), 11-22 .

Rerksuppaphol, S. & Rerksuppaphol, L. (2015). A randomized double-blind controlled trial of Lactobacillus acidophilus plus Bifidobacterium bifidum versus placebo in patients with hypercholesterolemia. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, *9*(3), KC01 .

Shemshad, N., Roozbeh Nasiraie, L. & Majidzadeh Heravi, R. (2021). Isolation of Probiotic Lactobacilli Bacteria from Traditional Naein Dairy Product (Koome).

*Iranian Journalof Medical Microbiology*, *15*(1), 85-106 .

Sivamaruthi, B. S., Kesika, P. & Chaiyasut, C. (2019). A mini-review of human studies on cholesterol-lowering properties of probiotics. *Scientia Pharmaceutica*, *87*(4), 26 .

Food Technology & Nutrition / Spring 2023 / Vol. 20 / No. 2

# Isolation and Identification of *Lactobacillus Acidophilus* Probiotic Bacteria from Traditional Tarkhineh Food and Their Ability to Lower Cholesterol and Triglyceride Levels in vitro

**P. Afshar[a], K. Amini[b*], H. Mohajerani[c], S. Saki[d]**

[a] PhD Student of the Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
[b*] Assistant Professor of the Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
[c] Assistant Professor of the Department of Biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
[d] Assistant Professor of the Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Medical Sciences, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran.

Received: 19 April 2022 Accepted: 9 August 2022

## Abstract



**Introduction**: Isolation and identification of probiotic strains from native foods can lead to finding strains with unique capabilities. The aim of this study was to isolate, identify and evaluate the ability of *Lactobacillus acidophilus* bacteria isolated from traditional Tarkhineh food in lowering cholesterol and triglyceride levels *in vitro*.

**Materials and Methods**: Native strains of *Lactobacillus acidophilus* were isolated from a local food called Tarkhineh using culture medium and identified based on phenotypic characteristics, standard biochemical tests and 16SrRNA sequencing. In the next step, the strains were examined for probiotic properties such as resistance to acid and bile and sensitivity to antibiotics. Cholesterol and triglyceride lowering activity of isolates in culture medium was also investigated by o-phthaldehyde method.

**Results**: The results showed that 16 strains of *Lactobacillus acidophilus* were isolated from Tarkhineh samples, among which four strains (S3, S12, S6, S5) showed 30 to 50% resistance, three strains (S7, S4, S10). had 50 to 75% resistance and 2 strains (S11, S1) had 75 to 100% growth in acidic MRS. In addition, strains S7 and S1 showed a growth rate of 0.3 to 0.5% and strains S4, S3, S11 grew at 0.7% bile salt in MRS medium. The highest cholesterol uptake was observed in S11 and S1 strains at 64± 0.23 and 60±0.18 ($p<0.01$) respectively. Strains S1 and S11 applied 72% ± 0.64 and 61 ± 0.25% triglyceride reduction respectively.

**Conclusion**: The data of this study showed that the native strains of *Lactobacillus acidophilus* isolated from the local food of Tarkhineh had the potential to absorb and reduce cholesterol and triglycerides of the culture medium. These strains can be studied in laboratory animals as probiotics capable of absorbing and removing fat**.**

***Keywords:*** *Cholesterol, Lactobacillus acidophilus, Probiotics, Tarkhineh.*

* Corresponding Author: dr_kumarss_amini@yahoo.com

علوم غذایی و تغذیه / بهار ۱۴۰۲ / سال بیستم / شماره ۲