جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از محصولات لبنی سنتی

مریم کاظمی میرکی[۱]، الهام معظمیان[۲*]، محمدجواد مختاری[۳]، مهرداد غلامزاد[۴]

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی ، مرودشت، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزد اسلامی، شیراز، ایران
۳. گروه زیست شناسی، واحد زرقان، دانشگاه آزاد اسلامی، زرقان، ایران
۴. گروه میکروبیولوژی و ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، واحد علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، تهران، ایران

***نویسنده مسئول:** elhammoazamian@gmail.com

چکیده:

لاکتوباسیلوس پلانتاروم یک باکتری مهم در صنایع غذایی است که به عنوان یک سویه مفید و کاربردی شناخته می‌شود. پتانسیل بالقوه ی پروبیوتیکی و توانایی ایجاد ایمنی از جمله مزیت‌های آن می‌باشد. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از مواد لبنی انجام شد. ۹۶ نمونه از مواد لبنی سنتی از مناطق مختلف استان فارس جمع‌آوری شد. نمونه ها در محیط کشت MRS تلقیح و مورفولوژی کلنی و شکل آنها بررسی شد. سپس رنگ آمیزی گرم و شناسایی ویژگی‌های بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، اکسیداز، تخمیر قندها و سیترات انجام شدند. در نهایت، با استفاده از روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام شد. با استفاده از روش‌های تشخیصی و بیوشیمیایی، ۱۱ جدایه‌ی باکتری *لاکتوباسیلوس* با موفقیت جداسازی شد و پس از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و توالی‌یابی، ۴ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تایید شدند. هر ۴ جدایه گرم مثبت، کاتالاز ، اکسیداز و سیترات منفی بودند و گلوکز، مانوز، ساکاروز و سوربیتول را تخمیر می‌کردند. تشخیص نهایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از طریق شناسایی مولکولی و تعیین توالی ژن 16S rRNA تأیید شد. نتایج نشان داد که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مواد لبنی وجود دارد و می‌توان با استفاده از بررسی شکل، ساختار، روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی، این گونه‌ی مهم را از مواد لبنی جداسازی کرد. همچنین، استفاده از روش‌های مورد استفاده در این تحقیق امکان جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی : باکتری اسیدلاکتیک، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، مواد لبنی، شناسایی مولکولی، تست بیوشیمیایی

مقدمه:

بررسی‌های دقیق تاریخی نشان می‌دهد که مبدأ فرآورده‌های تخمیری لبنی نظیر ماست، کفیر و... به تمدن‌های اولیه بشری در حدود ده هزار سال قبل از میلاد بر می‌گردد. طیف وسیعی از فرآورده‌های تخمیری در مناطق روستایی به طور سنتی از دیرباز تولید می‌شود. بسیاری از این محصولات به تخمیر خودبخودی توسط میکروفلور طبیعی شیر (به طور عمده باکتری‌های لاکتیکی) وابسته‌اند. از سوی دیگر، انجام هر نوع تخمیر به شرایط آب و هوایی منطقه تولید نیز بستگی دارد. باکتری‌های اسیدلاکتیک گروهی متنوع از باکتری‌های گرم مثبت و تولیدکننده ی لاکتیک اسید هستند که برای تغذیه و تخمیر غذا استفاده می‌شوند(Khushboo et al., 2023). *لاکتوباسیلوس*ها، جنس بسیار رایجی از این نوع باکتری‌ها هستند(Elagöz et al., 1996). از میان جمعیت گسترده *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* سویه‌ای بسیار چند منظوره و با خواص مفید است. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک باکتری اسیدلاکتیک هتروفرمانتاتیو اختیاری است. همچنین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از سویه‌های پروبیوتیک رایج در صنایع لبنی است که به طورگسترده در فرمانتاسیون صنعتی و پردازش مواد خام غذایی استفاده می شود(Guidone et al., 2014).

لاکتوباسیلوس پلانتاروم به عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان دارای توانایی بالای بقا در دستگاه گوارش است و می‌تواند جذب فلزات سنگین روده‌ای را کاهش دهد و استرس اکسیداتیو کبدی را تسکین دهد. بر طبق تعریف سازمان غذا و کشاورزی و سازمان بهداشت جهانی و سازمان ملل متحد یک افزودنی مجاز است و در لیست پیش بینی معتبر ایمنی به عنوان گونه‌ی ایمن برای حیوانات و انسان قرار دارد (Hazards et al., 2018; Ray & Joshi, 2014).

سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از غذاهای سنتی تخمیر شده استخراج شده‌اند، ویژگی‌های کاربردی بسیاری مانند خاصیت ضداکسیدانی دارند(Behera et al., 2018). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های مطالعه شده سویه‌های بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* توانایی تولید باکتریوسین‌های پلانتاریسین، پپتیدهای ضدمیکروب قابل استفاده در فرآورده‌های غذایی مختلف برای کاهش باکتری‌های حساس از جمله بیماریزاها است(da Silva Sabo et al., 2014).

تخمیر مواد غذایی با استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک راهکار مناسب برای بهبود ارزش‌های تغذیه‌ای و محتوای ویتامینی محصولات غذایی است(Panda et al., 2018; Swain & Ray, 2016). افزودن ویتامین‌های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (فولات، ریبوفلاوین، ویتامین B12 و غیره) به شیر تخمیری، ماست یا سویا می‌تواند غلظت ویتامین‌ها را افزایش داده و تأمین کننده مواد مغذی برای مصرف‌کنندگان باشد(Li et al., 2017). رژیم غذایی غنی از پروبیوتیک‌هایی مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با پیشگیری و درمان برخی از اختلالات گوارشی، مانند سندرم روده تحریک‌پذیر، التهاب دستگاه گوارش در نوزادان و کولیت التهابی مرتبط شده است(Nouri et al., 2018).

آنزیم لیپاز موجود در *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بسیاری از کاربردهای صنعتی مانند فرآوری غذا، سنتز آلی، ترکیب مواد شوینده و تولید روغن به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنزیم استراز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* منبعی برای بسیاری از استر هیدرولاز های میکروبی است زیرا می‌تواند طیف

گسترده‌ای از الکل‌های فنولی، استرهای زنجیره کوتاه و اسیدهای چرب تولید کند(Uppada et al., 2017).

شناسایی دقیق و قطعی میکروارگانیسم‌ها برای کاربردهای متنوعی از جمله مطالعات بیوتکنولوژیکی، صنعتی، زیست پزشکی، دارویی و زیست محیطی ضروری است. استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA و بررسی هم‌ترازی آن با سایر توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی برای شناسایی سویه‌های جدید دارای اهمیت است. گونه‌های باکتریایی حداقل یک نسخه از ژن 16S rRNA حاوی نواحی بسیار حفاظت شده دارند که برای شناسایی سویه‌های جدید استفاده می‌شود(Xue et al., 2021). در ایران، ابراهیمی و همکاران(۲۰۱۱) موفق به جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس* از محصولات لبنی سنتی ماست و پنیر شدند(Narimani et al., 2013). امامی و همکاران(۲۰۰۸) از محصولات لبنی شهرستان فسا و جهرم استان فارس از طریق تست‌های بیوشیمیایی *لاکتوباسیلوس بولگاریس*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس فرمانتوم*، *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* را جداسازی کردند(Emami & Noeiaghdam, 2008). علی‌رغم وجود چند تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک در استان فارس، در این تحقیقات، سویه‌ی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، به صورت هدفمند از محصولات لبنی سنتی از طریق تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی نشده است که مزیت این مطالعه محسوب می‌شود.

با وجود اینکه، در این تحقیق باکتری *لاکتوباسیلوس* علاوه بر تست‌های بیوشیمیایی، با تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA شناسایی شده است، پیش‌بینی رفتار این باکتری در شرایط طبیعی بدن و سیستم گوارش میزبان به سختی امکان‌پذیر است. با توجه به گسترش فزآینده محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی، امکان از دست دادن بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک وجود دارد. همچنین با توجه به فواید باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و افزایش استفاده از محصولات لبنی به‌عنوان ابزاری برای انتقال میکرواورگانیسم‌های مفید به دستگاه گوارش، جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از محصولات لبنی سنتی می‌تواند مسیر مناسبی برای تولید انبوه محصولات لبنی سنتی سودمند به ما عرضه کند. بنابراین، هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از منابع لبنی سنتی استان فارس بود تا این سویه‌ی بومی به منظور استفاده در صنعت غذا و زیست پزشکی معرفی گردد.

مواد و روش کار:

جمع آوری نمونه :

۹۶ نمونه فرآورده لبنی سنتی (ماست و دوغ) از مناطق مختلف استان فارس(شیراز، نی ریز، استهبان، سروستان، دشت ارژن) در بازه‌ی یک هفته (فروردین ۱۴۰۱) جمع‌آوری شد. نمونه ها در فالکون و شرایط استریل و در مجاورت بسته‌های یخی به آزمایشگاه میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت منتقل گردیدند. نمونه‌ها تا شروع آزمایش در دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس) نگهداری شدند. سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (کد ۱۰۵۸)، سویه *اشرشیا کلی*(کد ۱۳۹۹) به عنوان کنترل در تست‌های تشخیصی به صورت کشت فعال از مرکز منطقه‌ای کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران خریداری شد. رقت 10^{-1} تا رقت 10^{-7} از نمونه‌ها تهیه و تلقیح بر روی محیط کشت MRS-Agar

(Man-Rogosa-Sharp) (مرک، آلمان) صورت گرفت. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از گرماگذاری، کلنی‌های رشدیافته بر روی پلیت، انتخاب شدند و بعد از کشت‌های متوالی، سویه‌های خالص‌شده جداسازی شدند(Padasht et al., 2023).

رنگ آمیزی گرم:

تمایز و تشخیص *لاکتوباسیلوس*ها از سایر باکتری‌ها توسط رنگ آمیزی گرم انجام شد. باکتری‌های *باسیلی* شکل گرم مثبت (رنگ بنفش) انتخاب شدند(Haghshenas et al., 2017).

تست‌های بیوشیمیایی:

تست‌های مختلف بیوشیمیایی از جمله تست کاتالاز، تست اکسیداز و تست سیترات برای تشخیص و شناسایی *لاکتوباسیلوس*ها انجام شد. آزمایش کاتالاز با قرار دادن یک قطره پراکسید هیدروژن (مرک، آلمان) روی یک کلنی از میکروارگانیسم‌ها که روی یک لام میکروسکوپی قرار داده شده بود، انجام شد. تشکیل حباب یا کف، مثبت در نظر گرفته شد. تست اکسیداز توسط دیسک‌های حاوی تترامتیل پارافنلین دی آمین دی هیدروکلراید انجام شد، تولید رنگ ارغوانی، اکسیداز مثبت در نظر گرفته شد. در تست کاتالاز و اکسیداز ، *اشرشیا کلی*(۱۳۹۹) به عنوان کنترل مثبت و سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۱۰۵۸) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. تست سیترات در محیط سیمون سیترات (سبز رنگ) (مرک، آلمان) حاوی معرف بروموتیمول بلو انجام شد و عدم تغییر رنگ محیط به آبی منفی در نظر گرفته شد. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۱۰۵۸) به عنوان کنترل منفی استفاده شد(Shuhadha et al., 2017; Silva et al., 2015).

تست تخمیر قندها یا تست API(Analytical Profile Index) :

تست تخمیر قند برای بررسی توانایی *لاکتوباسیلوس* ها در تخمیر قندها و تایید جنس و شناسایی عملکرد بیوشیمیایی باکتری‌ها مورد استفاده قرار گرفت. توانایی تخمیر قند *لاکتوباسیلوس* های جداسازی شده به وسیله تست API (مدل 20E - بیومریو، فرانسه) انجام شد. در این تست ۵ سی سی سوسپانسیون باکتری مورد نظر تهیه و در حفره های کیت که حاوی ترکیبات قندی لیوفلیزه شده می باشند وارد شد و طبق دستورالعمل سازنده، تخمیر قندهای گلوکز، مانوز، اینوزیتول، سوربیتول، رامنوز، ساکارز، آمیلوز و آرابینوز بررسی گردید. تخمیر قند توسط *لاکتوباسیلوس* سبب تغییراتی مانند تولید اسید یا گاز شد(Sun et al., 2022). تبدیل رنگ ارغوانی بـه زرد نشانه‌ی تخمیر قند در نظر گرفته شد. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۱۰۵۸) به عنوان کنترل مثبت و *اشرشیا کلی*(۱۳۹۹) به عنوان کنترل منفی استفاده شد(Cretin et al., 2017).

شناسایی مولکولی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR: Polymerase Chain Reaction) و با استفاده از ژن 16S rRNA:

پس از انتخاب باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز ، اکسیداز ، سیترات منفی و دارای توانایی در تخمیر قند گلوکز، مانوز، سوربیتول و ساکارز، شناسایی مولکولی انجام شد. پرایمرهای مربوط به ژن 16S rRNA گونه *لاکتوباسیلوس* با استفاده از سایت NCBI(National Center for Biotechnology Information) و بررسی مقالات انتخاب شد. سپس واکنش PCR انجام شد و در نهایت برای مشاهده ژن 16S rRNA نمونه ها، الکتروفورز(BIO-RAD، سنگاپور) انجام شد(Hou et al., 2018).

استخراج DNA باکتری از طریق کیت استخراج DNA باکتری‌های گرم مثبت (سیناژن، ایران) انجام شد. طبق دستورالعمل موجود در کیت، ابتدا 5ml از باکتری مورد نظر درون میکروتیوپ ریخته شد. به مدت ۵ دقیقه با دور ۴۵۰۰ rpm سانتریفیوژ انجام شد، مایع‌رویی را دور ریخته و رسوب با ۱۰۰ µl آنزیم لیزوزیم و ۱۰۰ µl بافر لیزکننده اولیه مخلوط شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد، سپس ۲۵ µl آنزیم پروتئیناز K و ۲۰۰ µl محلول لیزکننده افزوده شد و در آون با دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۳۰۰ µl محلول ته‌نشینی اضافه و ۵ ثانیه ورتکس شد و به وسیله‌ی سمپلر به ستون منتقل شد و در دور ۱۲۰۰۰rpm برای ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع دور ریخته شد و ۶۰۰ µl بافر شستشو I به ستون اضافه و سانترفیوژ (۱۲۰۰۰rpm/ ۱دقیقه) شد و مایع دور ریخته شد، ۶۰۰ µl بافر شستشو II به ستون اضافه و سانترفیوژ (۱۲۰۰۰rpm/ ۱دقیقه) شد. مایع‌رویی دور ریخته و سپس این مرحله تکرار گردید و لوله‌ی جمع‌آوری جدید گذاشته شد. ۳۰µl از بافر شستشو به آن اضافه گردید و ستون ها به مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه قرار داده شد و ۱ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید، در این مرحله DNA استخراج شد(۲۰).

در واکنش PCR از توالی آغازگر رفت FLB190، 5′- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3′ و توالی آغازگر RLB190 برگشت، 5′-CGG TAT TAG CAT CTG TTT CC-3′ (SMOBIO، تایوان) استفاده شد(Hou et al., 2018).

DNA استخراج شده باکتری‌ها طبق برنامه زمان‌بندی در جدول ۱ تحت واکنش PCR گرادیانت (سیناکلون، ایران) قرارگرفتند. دستگاه ترموسایکلر(BIO-RAD، سنگاپور) در یک طیف دمایی بین ۵۴-۶۴ درجه سلسیوس تنظیم شد و بهترین دما براساس بهترین باند بر روی ژل الکتروفورز براساس مارکر شناسایی مولکولی انتخاب شد(Abadi et al., 2023). پس از انجام PCR ، وجود یا عدم وجود محصول موردنظر و انجام کامل و صحیح واکنش بررسی شد و محصول PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید. پس از ۳۵ دقیقه، ژل بر روی دستگاه ترانس ایلومیناتور فرابنفش (COD-5، کیاژن، ایران) قرار داده شد و باندهای DNA مشاهده گردید(Dubernet et al., 2002; Naji et al., 2021).

جدول ۱- شرایط دمایی و پروتکل واکنش PCR جدایه‌های لاکتوباسیلوس

مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
دناتوره شدن اولیه	۹۴°C	۳ دقیقه	۱
دناتوره شدن	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	۳۴
اتصال	۵۵/۹ °C	۳۰ ثانیه	
طویل شدن	۷۲ °C	۵۰ ثانیه	
طویل شدن نهایی	۷۲ °C	۵ دقیقه	۱
نگه داری	۱۲-۴ °C	۱۲-۴ °C	بی نهایت

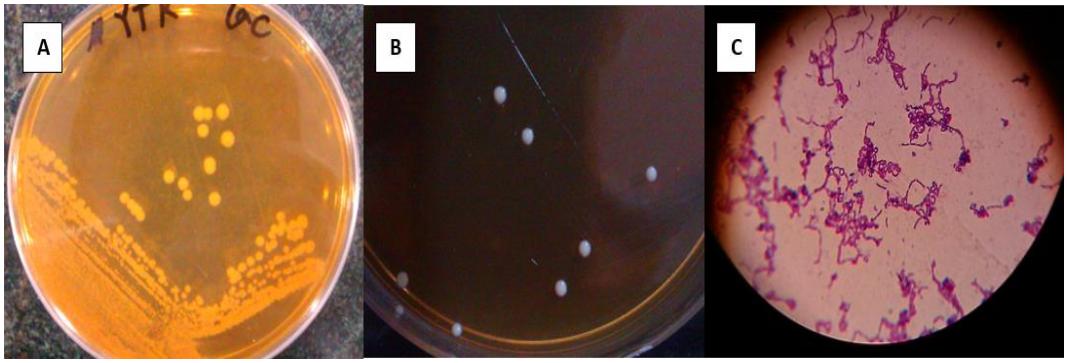
تعیین توالی به روش سنگر:

در نهایت، اطمینان از اختصاصی بودن آزمایش و تشخیص مولکولی جدایه ها توسط تعیین توالی محصول PCR با تکنیک سنگر(توالی‌یابی بر پایه خاتمه زنجیره) (میکروسینس سوئیس) توسط شرکت توپاز ژن (ایران) انجام شد. نتیجه‌ی توالی‌یابی نمونه‌های مورد آزمایش با توالی‌های موجود در بانک ژن با برنامه نوکلئوتید بلاست(Nucleotide blast) مقایسه گردید و میزان تشابه نمونه‌های توالی‌یابی شده با توالی موجود در بانک ژن مقایسه شد(Asaadi et al., 2019).

نتایج :

۹۶ نمونه از مناطق مختلف استان فارس جمع‌آوری شد. به طور کلی براساس تست‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندها و شناسایی مولکولی ۱۱ جدایه *لاکتوباسیلوس* جداسازی شد، که از این تعداد، ۴ جدایه سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تایید شدند. طبق تعریف فدراسیون بین المللی محصولات و سازمان بین المللی استاندارد، باکتری‌های اسیدلاکتیک گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند. همه باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای متابولیسم تخمیری هستند و اسیدلاکتیک را به عنوان محصول نهایی تخمیر کربوهیدرات تولید می‌کنند.

از بین کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت MRS آگار، ۳۵ کلنی که شکل ظاهری آنها سفید - کرمی و صاف بود، به کمک سوزن استریل برداشته شد (شکل ۱-A-B). سویه‌های جدا شده براساس محل نمونه‌برداری شماره‌گذاری گردید. طی انجام مراحل رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده نمونه‌ها زیر میکروسکوپ نوری همه ی ۳۵ کلنی، به رنگ بنفش، گرم مثبت و بدون اسپور تشخیص داده شد. همچنین *باسیلی* بودن آن‌ها تایید گردید. مرفولوژی کلنی در شکل۱-C آمده است.



شکل ۱. بررسی ویژگی‌های ریخت شناسی باکتری‌های جداسازی شده از لبنیات سنتی استان فارس : .A و B : ظاهر کلنی رشد یافته بر روی محیط کشت MRS آگار. C : نتیجه رنگ‌آمیزی گرم زیر میکروسکوپ.

جدول ۲ – تست‌های بیوشیمیایی باکتری‌های استخراج شده از لبنیات سنتی استان فارس

سویه‌ها	آزمون گرم	تست کاتالاز	تست اکسیداز	تست تراکت	سویه‌ها	آزمون گرم	تست کاتالاز	تست اکسیداز	تست تراکت
E1	+	-	-	-	LD	+	-	–	–
E2	+	-	-	-	LE	+	+	+	–
E3	+	+	-	-	LF	+	–	–	–
E4	+	-	-	-	LG	+	–	–	–
E5	+	-	-	-	LH	+	–	–	–
E6	+	-	-	-	LI	+	–	–	–
E7	+	-	-	-	LJ	+	–	–	–
E8	+	-	-		LK	+	–	–	–
E9	+	-	-	-	LL	+	–	–	–
E10	+	-	-	-	LM	+	–	–	–
E11	+	-	-	-	LN	+	-	–	–
E12	+	-	+	+	LO	+	–	–	–
LA	+	-	-	-	LP	+	–	–	–
LB	+	-	-	-	LQ	+	+	–	–
LC	+	-	-	-	LR	+	–	–	–

LZ	+	-	–	–	LS	+	-	–	–
LU	+	-	–	–	LV	+	-	–	–
LW	+	-	–	–					

تشخیص عملکرد بیوشیمیایی جدایه‌ها، به وسیله‌ی آزمون اکسیداز و کاتالاز و سیترات انجام شد و جدایه‌ها بر اساس این سه تست انتخاب شدند. نتایج تست‌ها در جدول۲ آورده شده است.

پس از اطمینان از گرم مثبت، اکسیداز منفی و کاتالاز منفی و سیترات منفی بودن جدایه‌های مورد نظر، آزمون تخمیر قند به عنوان تست تاییدی انجام شد و نمونه‌های *لاکتوباسیلوس* تشخیص داده شد، نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

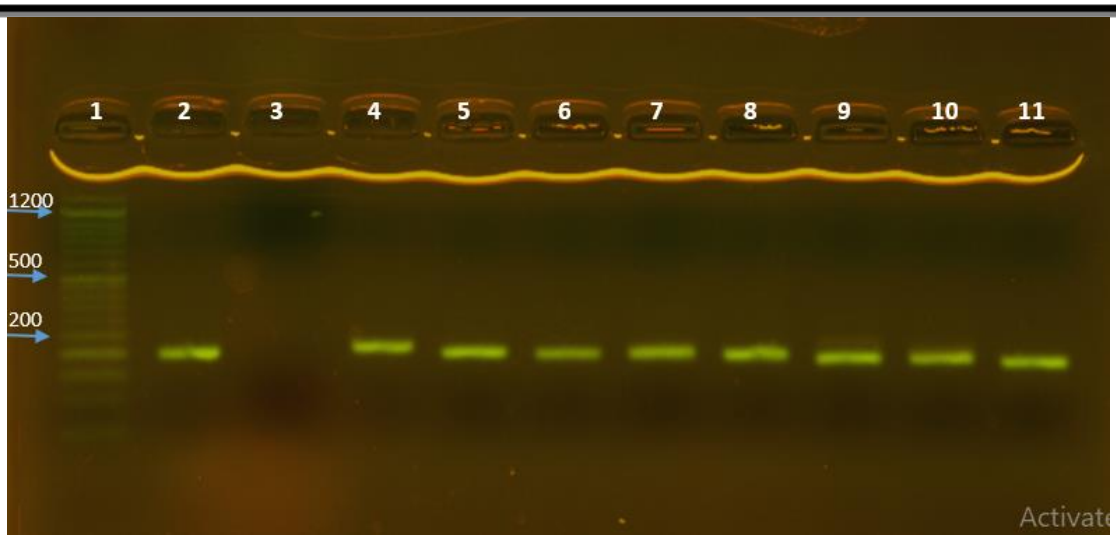
جدول ۳- تخمیر قندی توسط سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از از لبنیات سنتی استان فارس

نمونه لبنیات سنتی*	گلوکز	مانوز	اینوزیتول	سوربیتول	رامنوز	ساکاروز	امیگدالوز	آرابینوز
LI-LM-LS-E5	+	+	–	+	–	+	–	–
LC-LJ-LO-LV-LW	+	+	–	+	–	+	+	–
LZ-LH-LF-LK-LP	+	+	-	+	–	+	-/+	–

* نمونه های مناطق مختلف استان فارس: LI: ماست سنتی سروستان، LM: ماست سنتی نی ریز، LS : ماست سنتی دشت ارژن، E5: دوغ سنتی سروستان، LC: ماست سنتی استهبان، LJ: ماست سنتی شیراز، LO: پنیر سنتی شیراز، LV: دوغ سنتی استهبان، LW: دوغ سنتی دشت ارژن، LZ-LH: پنیر سنتی نی ریز، LF-LK: ماست محلی انجیره، LP: پنیر سنتی دشت ارژن.

شناسایی باکتری با استفاده از روش مولکولی PCR

DNA استخراج شده از نمونه‌ها بعد از قرار گرفتن در دستگاه ترموسایکلر، الکتروفورز شد. محصول PCR ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتری *لاکتوباسیلوس* با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه، قطعه‌ای به طول ۱۹۰جفت باز می باشد. نتایج شناسایی مولکولی ژن 16S rRNA جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* که دارای باند مدنظر بودند در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن 16S rRNA جدایه‌های باکتری *لاکتوباسیلوس*: ستون ۱، مارکر ۵۰ جفت بازی شرکت SMOBIO ؛ ستون ۲، کنترل مثبت *لاکتوباسیلوس روتری*؛ ستون ۳، کنترل منفی؛ ستون ۴-۱۱، جدایه های *لاکتوباسیلوس*(۱۹۰ جفت باز)

تعیین توالی

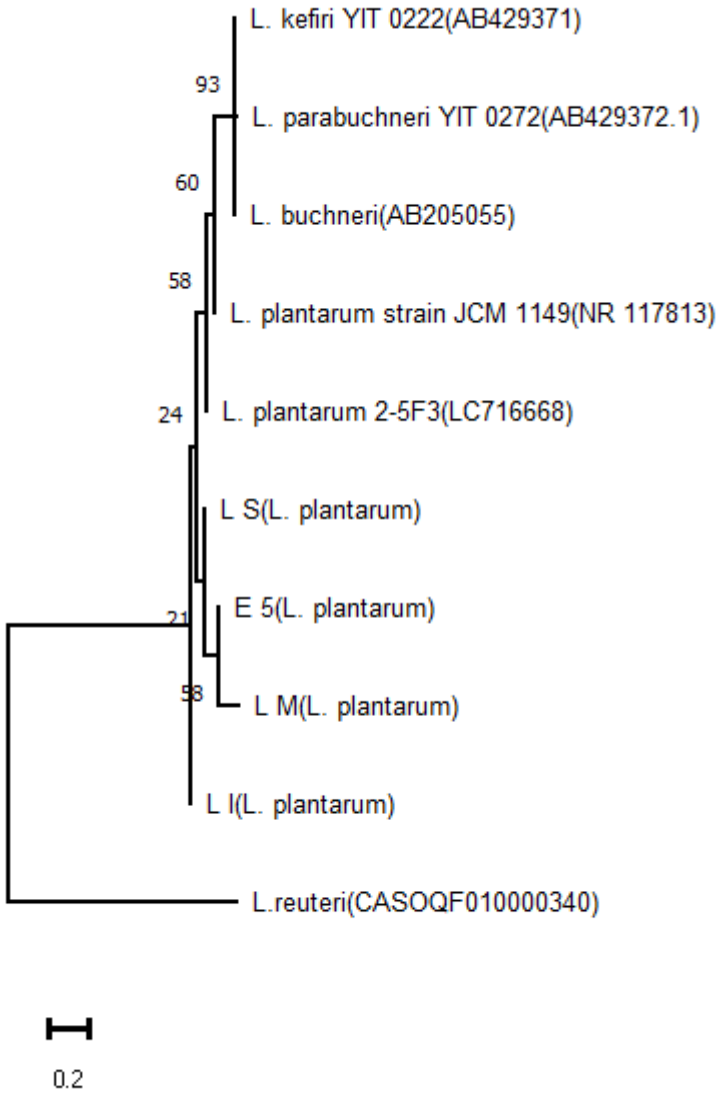
نتایج PCR جهت تایید و مشخص شدن جنس باکتری و توالی‌یابی توسط شرکت توپاز ژن به سوئیس فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی ۱۱ جدایه *لاکتوباسیلوس* را تایید و پس از هموlوژی نوکلئوتید بلاست از ۱۱ جدایه، ۴ جدایه با هم‌ترازی بالای ۹۷٪ *پلانتاروم* تشخیص داده شد(جدول ۴). جنس *پلانتاروم* با ۳۶/۳۶ درصد بیشترین فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی مورد مطالعه را به خود اختصاص داد.

جدول ۴ - نتایج بلاست نمونه‌های *لاکتوباسیلوس* تعیین توالی شده

کد نمونه	نتیجه‌ی بلاست(نزدیک ترین گونه)	درصد هموlوژی	کد نمونه	نتیجه‌ی بلاست(نزدیک‌ترین گونه)	درصد هموlوژی
E5	*Lactobacillus plantarum*	۹۷/۸۹ %	**LI**	*Lactobacillus plantarum* strain NWAFU1572	%۱۰۰
LS	*Lactobacillus plantarum* straiQn Gt4	%۹۸	**LM**	*Lactobacillus plantarum* strain NWAFU1466	%۹۹

ترسیم درخت فیلوژنتیکی :

درخت فیلوژنتیکی از روش Neighbour joining به دست آمد. فاصله‌های تکاملی با استفاده از روش احتمالی حداکثر کامپوزیت محاسبه شده و در هر واحد تعداد جایگزینی‌های پایه قرار می گیرد. این تجزیه و تحلیل شامل ۱۰ توالی نوکلئوتیدی بود. درخت فیلوژنی حاصل، نشان دهنده‌ی ارتباط بین توالی‌های 16S rRNA جدایه‌های مذکور و توالی های مرجع (*لاکتوباسیلوس روتری- لاکتوباسیلوس کفیری- لاکتوباسیلوی بوچنری و لاکتوباسیلوس پاربوپنری*) در بانک ژن می باشد(شکل ۳).



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbour joining بر مبنای توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA بین سویه‌های جداسازی شده از محصولات لبنی با دیگر سویه‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و گروه خارجی (*لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس کفیری*، *لاکتوباسیلوی بوچنری* و *لاکتوباسیلوس پاربوپنری*) ترسیم شده است. درصد شباهت گونه‌های مرتبط که در آزمون bootstrap (۵۰۰ تکرار) به هم خوشه‌ای شدند، در کنار شاخه‌ها نشان داده شده است. فاصله‌های تکاملی با استفاده از روش Maximum Composite Likelihood محاسبه شدند و در واحد تعداد جانشینی‌های پایه در هر سایت قرار دارند. این تجزیه و تحلیل شامل ۱۰ توالی نوکلئوتیدی بود. تمام موقعیت‌های مبهم برای هر جفت توالی حذف شدند. در مجموع ۱۶۸۴ موقعیت در مجموعه داده‌های نهایی وجود داشت .تجزیه و تحلیل تکاملی در MEGA11انجام شد.

بحث :

پژوهش حاضر ۹۶ نمونه محصول لبنی از مناطق مختلف جغرافیایی استان فارس را مورد بررسی قرار داد. ۳۱ میکروارگانیسم با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند که روی محیط‌کشت MRSشامل *باسیل*‌های میله‌ای گرم مثبت بودند، همچنین کاتالاز، سیتوکروم اکسیداز و سیترات منفی بودند. از طرفی تخمیر ۴ قند به عنوان عاملی برای تشخیص سویه‌ها استفاده شد. با استفاده از روش PCR، ۱۱ نمونه به عنوان *لاکتوباسیلوس* تایید شدند و پس از بررسی درصد همولوژی، ۴ سویه (۳۶/۳۶ درصد نتیجه تعیین توالی) مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تشخیص داده شد.

با توجه به اهمیت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* و فواید آن‌ها، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از محصولات لبنی سنتی در سال‌های گذشته مورد توجه قرارگرفته است. جستجوی باکتری‌های سودمند در محصولات لبنی پتانسیل معرفی سویه‌های جدید جهت بهره‌برداری در صنایع غذایی را فراهم کرده است. دهقانی چم پیری و همکاران در سال ۲۰۲۳ *لاکتوباسیلوس*‌ها را از دوغ محلی استان چهارمحال و بختیاری جداسازی کردند، آن‌ها باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس جنسنی*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس برویس* را جداسازی نمودند(Dehghani Champiri et al., 2023). کوهساری و همکاران در سال ۱۳۹۷ باکتری‌های اسیدلاکتیک از محصولات لبنی محلی شهرستان گرگان را جداسازی کردند که از ۲۴ نمونه دوغ و پنیر محلی و ۴ نمونه صنعتی، در مجموع ۷۳ جدایه شناسایی شدند که در این بین *لاکتوباسیلوس کازئی* با ۲۴/۳۴ درصد بیشترین فراوانی را داشت و باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی نشد(Koohsari et al., 2019). دعوتی در سال ۱۳۹۶ در پژوهشی *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس دورانس*، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرینتوشنسیز*، *لاکتوباسیلوس جانسونی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را از ماست گوسفندی عشایر الوند جداسازی کرد(Davati, 2018). در منابع مختلف برای جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از محیط کشت MRS آگار استفاده شده و گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴-۷۲ ساعت گزارش شده است. همچنین با توجه به گرم مثبت بودن باکتری *لاکتوباسیلوس*، آزمون گرم به عنوان روش تشخیصی ابتدایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. یی و همکاران در سال ۲۰۱۹ از ماست طبیعی تخمیر شده، با بررسی مورفولوژی، رنگ‌آمیزی گرم و تشخیص مولکولی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را جداسازی کردند(Yi et al., 2019). ونتاساوا و همکاران در سال ۲۰۱۷، سویه‌های *لاکتوباسیلوس* را از شیر تخمیرشده گاو بر روی MRS آگار جدا سازی کردند، در این تحقیق جدایه‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس بولگاریس* و *لاکتوباسیلوس سالواریوس* از لحاظ مورفولوژیکی، بررسی میکروسکوپی، بیوشمیایی و سیستم تخمیر کربوهیدراتی مشخص گردید(Vantsawa et al., 2017). در تحقیق حاضر نیز با استفاده از محیط کشت مذکور کلنی‌های خالص *لاکتوباسیلوس* انتخاب شد و باکتری‌های گرم مثبت با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم تشخیص داده شد.

روش مرسوم در شناسایی *لاکتوباسیلوس* ها پس از جداسازی، آنالیز خصوصیات بیوشیمیایی آنها از جمله تست کاتالاز، اکسیداز، سیترات و تخمیر قندها ست. در منابع مختلف نوع و تعداد قندها متفاوت است. حسن و همکاران در سال ۲۰۲۲ به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس*، از روش‌های رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالاز و اکسیداز، و تولید اسید از گلوکز استفاده نمودند(Hassan et al., 2023). ناجی و همکاران در سال ۲۰۲۱، از تست تخمیر قندی شامل قندهای آرابینوز، ترهالوز، ساکاروز، رافینوز، رامنوز ، لاکتوز، مانیتول و مالتوز، سوربیتول و زایلوز به منظور شناسایی گونه‌های *لاکتوباسیلوس* استفاده کردند. بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۷ نمونه) و *لاکتوباسیلوس اجلیس* (۶ نمونه) به دست آمد و کمترین فراوانی در *لاکتوباسیانوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پنتیس* بود(Naji et al., 2021). نوری و همکاران در سال ۲۰۱۸ باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را به روش بیوشیمیایی و مولکولی جداسازی و شناسایی کردند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در میان گونه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس* عادت پذیرترین گونه شناخته شد(Nouri et al., 2018). در این تحقیق نیز تمامی جدایه‌ها کاتالاز، اکسیداز و سیترات منفی تشخیص داده شدند و از تخمیر قندهای گلوکز، مانوز، اینوزیتول، سوربیتول، رامانوز، ساکارز، آمیلوز و آرابینوز برای شناسایی بیوشیمیایی *لاکتوباسیلوس* ها استفاده شد. با مقایسه نتایج بیوشیمیایی باکتری‌های مورد بررسی، سویه‌های *لاکتوباسیلوس* تشخیص داده شد.

در منابع مختلف توصیه شده است که از روش‌های مولکولی تکمیلی برای تایید تشخیص سویه‌های جدا شده بهره‌گیری شود زیرا شباهت خصوصیات فیزیولوژی در بین برخی جدایه‌ها دیده می‌شود. استفاده از مارکرهای مولکولی مانند مقایسه‌ی توالی ژن 16S rRNA در بانک‌های اطلاعاتی، روشی مناسب برای شناسایی دقیق‌تر *لاکتوباسیلوس*ها است. اورشف و همکاران نیز در سال ۲۰۲۴ شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک را بر اساس کیت API 50 CH انجام دادند. سپس، باکتری‌ها بر اساس روش‌های مولکولی و تکثیر ژن 16S rRNA و 23S rRNAدر سطح جنس و گونه شناسایی شدند(Urshev et al., 2024). رهی و مرحمتی زاده در سال ۲۰۲۲ در پژوهشی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* را از محصولات لبنی سنتی شهرستان گچساران جداسازی کردند، آنها از آنالیز بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، تخمیر قند ها و روش مولکولی برای شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* استفاده کردند(Rahi & Marhamatizadeh, 2022). همچنین، لیو و همکاران در سال ۲۰۲۱ باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* مشتق شده از سبزیجات تخمیری در شانشی، چین را از روش مولکولی و بررسی توالی ژن 16S rRNA شناسایی کردند و توانستند ۱۵ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و ۹ جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* را جداسازی کنند(Liu et al., 2022). وجود *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در محصولات لبنی سنتی در مطالعه ظفرمختاریان و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش شده است. این محققین حضور *لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوزوس و لاکتوباسیلوس بوچنری* را در نمونه های شیر و ماست گوسفندی روستاهای شهرستان ارومیه را با تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از PCR تایید نمودند(Zafar mokhtarian et al., 2018). تادسه و همکاران در سال ۲۰۱۸ جداسازی و شناسایی باکتری‌های

اسیدلاکتیک را انجام دادند، این مطالعه حضور گونه‌های مختلف باکتریایی را در خمیر *تف* تخمیری با استفاده از ژن 16S rRNA تایید کرده است(Tadesse et al., 2018). در این تحقیق نیز برای تشخیص دقیق‌تر و شناسایی باکتری‌ها، DNAنمونه‌ها استخراج و ژن 16S rRNA تکثیر شد و سپس با ژل الکتروفورز مشاهده شد. نتایج تعیین توالی، ۱۱ جدایه ی *لاکتوباسیلوس* را تایید کرد. از این ۱۱ جدایه، ۴ جدایه *پلانتاروم* و بقیه، سویه‌های دیگر *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند. در تحقیقات مشابه، فراوان‌ترین *لاکتوباسیلوس*‌های موجود در محصولات لبنی شهرستان جهرم، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* معرفی شدند. تفاوت در سویه‌های جداسازی شده‌ی *لاکتوباسیلوس* در مناطق مختلف ایران احتمالا به دلیل تفاوت اقلیم و آب و هوا است. بنابراین، شناسایی مولکولی و شباهت توالی ژن 16S rRNA باکتری‌ها نقش تعیین کننده‌ای در شناسایی باکتری دارد(Dorri et al., 2013).

علی‌رغم شناسایی مولکولی این جدایه، پیش بینی دقیق توانایی تکثیر این باکتری در محیط روده مشکل است، بنابراین پیشنهاد می‌شود جهت معرفی این جدایه به عنوان پروبیوتیک بومی، دیگر شاخص‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از جمله میزان بقاء و تحمل شرایط اسیدی معده و املاح صفراوی روده، در کنار انجام این آزمون‌ها در شیشه(in vivo) در حیوانات آزمایشگاهی مورد آزمون قرار گیرد (Koohsari et al., 2019; Taye et al., 2021). با توجه به نتیجه‌ی این تحقیق می‌توان امیدوار بود از جدایه‌هایی همچون *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان باکتری‌های بومی سودمند در تولید محصولات لبنی و صنایع غذایی استفاده شود.

نتیجه گیری کلی:

نتایج این تحقیق که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد مرودشت انجام شد، حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که از مفیدترین باکتری‌های پروبیوتیک و اسیدلاکتیک هستند، را در محصولات لبنی سنتی استان فارس اثبات کرد. علاوه بر این، جنس *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ۳۶/۳۶ درصد از فراوانی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی مورد مطالعه را به خود اختصاص داد.

منابع:

Abadi, M. E. G. M., Hosseini-Safa, A., Habibi, S., Dehghan, M., Forouzani-Moghaddam, M. J., & Oshaghi, M. (2023). Isolation and characterization of the *lactobacillus* strain from honey and its probiotic properties. *Iranian journal of microbiology*, *15*(3), 439.

Asaadi, H., Eshaghi Milasi, Y., & Yazdansetad, S. (2019). Isolation and molecular identification of carotenoid-producing bacteria. *Nova Biologica Reperta*, *6*(1), 61-69.

Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with functional properties: an approach to increase safety and shelf-life of fermented foods. *BioMed research international*, *2018*(1), 9361614.

Cretin, B., Philippi, N., Bousiges, O., Dibitonto, L., Sellal, F., Martin-Hunyadi, C., & Blanc, F. (2017). Do we know how to diagnose epilepsy early in Alzheimer's disease? *Revue neurologique*, *173*(6), 374-380.

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, *64*, 527-536.

Davati, N. (2018). Isolation and Identification of Indigenous Lactic Acid Bacteria from Traditional Yogurt Produced from Ewe's Milk from Alvand Nomads Region and Evaluation of Their Acidifying Potential. *Journal of food science and technology(Iran)*, *15*(74), 222-213.

Dehghani Champiri, I., Bamzade, Z., Rahimi, E., & Rouhi, L. (2023). Isolation of Lactic Acid Bacteria from Local Yogurt Samples in Chaharmahal and Bakhtiari Province: The Assessment of Probiotic Characteristics. *Iran J Med Microbiol* *17*(6), 669-679.

Dorri, K., Namdar, N., & HemayatkhahJahromi, V. (2013). Isolation of lactobacilli from dairy products and their effects on the main pathogenic bacteria in stomach and intestine. *Medical Laboratory Journal*, *7*(1), 22-28.

Dubernet, S., Desmasures, N., & Guéguen, M. (2002). A PCR-based method for identification of *lactobacilli* at the genus level. *FEMS microbiology letters*, *214*(2), 271-275.

Elagöz, A., Abdi, A., Hubert, J.-C., & Kammerer, B. (1996). Structure and organisation of the pyrimidine biosynthesis pathway genes in *Lactobacillus plantarum*: a PCR strategy for sequencing without cloning. *Gene*, *182*(1-2), 37-43.

Emami, A., & Noeiaghdam, R. (2008). Cholesterol Assimilation with Isolated *lactobacilli* Strains of Fars' Local Dairy Products. *Armaghane Danesh*, *13*(3), 45-56.

Guidone, A., Zotta, T., Ross, R. P., Stanton, C., Rea, M. C., Parente, E., & Ricciardi, A. (2014). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains: A multivariate screening study. *LWT-Food Science and Technology*, *56*(1), 69-76.

Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., Barzegari, A., & Khosroushahi, A. Y. (2017). Isolation and characterization of probiotics from dairies. *Iranian journal of microbiology*, *9*(4), 234.

Hassan, A. A. M., Sakr, S. S., Ali, A. A., Mohamed Ahmed, I. A., & Elkashef, H. (2023). Isolation, identification, and biochemical characterization of five *Lacticaseibacillus* strains from Oggtt: A traditional fermented and dried buttermilk. *Food Science & Nutrition*, *11*(2), 1040-1050.

Hazards, E. P. o. B., Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R.,

Girones, R., Koutsoumanis, K., Lindqvist, R., & Nørrung, B. (2018). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. *Efsa Journal*, *16*(1), e05131.

Hou, Q., Bai, X., Li, W., Gao, X., Zhang, F., Sun, Z., & Zhang, H. (2018). Design of primers for evaluation of lactic acid bacteria populations in complex biological samples. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2045.

Khushboo, Karnwal, A., & Malik, T. (2023). Characterization and selection of probiotic lactic acid bacteria from different dietary sources for development of functional foods [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, *14*.

Koohsari, H., Rashti, Z., & Arab, S. (2019). The Isolation of lactic acid bacteria from local dairy products of Gorgan township with the ability to inhibit the growth of some gastrointestinal pathogens. *Journal of Food Microbiology*, *6*(3), 22-36.

Li, P., Gu, Q., Yang, L., Yu, Y., & Wang, Y. (2017). Characterization of extracellular vitamin B12 producing *Lactobacillus plantarum* strains and assessment of the probiotic potentials. *Food chemistry*, *234*, 494-501.

Liu, C., Xue, W.-j., Ding, H., An, C., Ma, S.-j., & Liu, Y. (2022). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables in Shaanxi, China. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 774903.

Naji, M., Norouzi, J., & Saffarian, P. (2021). Antimicrobial properties of *lactobacilli* isolated from soya on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*. *Research in Medicine: Journal of Research in Medical Sciences*, *45*(2).

Narimani, T., Tarinejad, A., & Hejazi, M. A. (2013). Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional dairy products of Kleibar, Heris and Varzaghan. *Food Hygiene*, *3*(Autumn 3(11)), 23-37.

Nouri, S., Nazari, S., & Hosseyni, P. (2018). Isolation and Biochemical and Molecular Identification of *Lactobacillus Plantarum* Bacteria from Rhizosphere of Lenjan Rice. *Biological Journal of Microorganism*, *7*(27), 61-71.

Padasht, N., Issazadeh, K., & Shah Illi, M. (2023). Cytotoxic Effects of *Lactobacillus Cytoplasmic* Extract isolated from Guilan province dairy products on Colon Cancer Cell Line (HT-29). *Biological Journal of Microorganism*, *12*(46), 13-25.

Panda, S. K., Ray, R. C., Mishra, S. S., & Kayitesi, E. (2018). Microbial processing of fruit and vegetable wastes into potential biocommodities: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, *38*(1), 1-16.

Rahi, A., & Marhamatizadeh, M. H. (2022). Investigating the Inhibitory Effect of Probiotic *Lactobacillus* Species Isolated From Dairy Products. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, *9*(3), 103-108.

Ray, R. C., & Joshi, V. (2014). Fermented foods: past, present and future. *Microorganisms and fermentation of traditional foods*, 1-36.

Shuhadha, M., Panagoda, G., Madhujith, T., & Jayawardana, N. (2017). Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus* sp. isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. *The Ceylon medical journal*, *62*(3), 159-166.

Silva, L. F., Casella, T., Gomes, E. S., Nogueira, M. C. L., De Dea Lindner, J., & Penna, A. L. B. (2015). Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Journal of food science*, *80*(2), M411-M417.

Sun, J., Silander, O., Rutherfurd-Markwick, K., Wen, D., Davy, T. P.-p., & Mutukumira,

A. N. (2022). Phenotypic and genotypic characterisation of *Lactobacillus* and *yeast* isolates from a traditional New Zealand Māori potato starter culture. *Current Research in Food Science*, *5*, 1287-1294.

Swain, M. R., & Ray, R. C. (2016). Nutritional values and bioactive compounds in lactic acid fermented vegetables and fruits. *Lactic acid fermentation of fruits and vegetables*, *1*, 37-52.

Tadesse, B. T., Tesfaye, A., Muleta, D., Bahiru, A., Terefework, Z., & Wessel, G. (2018). Isolation and molecular identification of lactic acid bacteria using 16s rRNA genes from fermented Teff (Eragrostis tef (Zucc.)) dough. *International journal of food science*, *2018*(1), 8510620.

Taye, Y., Degu, T., Fesseha, H., & Mathewos, M. (2021). Isolation and identification of lactic acid bacteria from cow milk and milk products. *The Scientific World Journal*, *2021*(1), 4697445.

Uppada, S. R., Akula, M., Bhattacharya, A., & Dutta, J. R. (2017). Immobilized lipase from *Lactobacillus plantarum* in meat degradation and synthesis of flavor esters. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *15*(2), 331-334.

Urshev, Z., Doynova, D., Prasev, I., Denkova-Kostova, R., Koleva, A., Denkova, Z., Goranov, B., & Kostov, G. (2024). Identification of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Sourdoughs Prepared with Different Flour Types. *Applied Sciences*, *14*(5), 2093.

Vantsawa, P. A., Maryah, U. T., & Bulus, T. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic potential from fermented cow milk (nono) in Unguwar Rimi Kaduna State Nigeria. *American Journal of Molecular Biology*, *7*(2), 99-106.

Xue, Z., Brooks, J. T., Quart, Z., Stevens, E. T., Kable, M. E., Heidenreich, J., McLeod, J., & Marco, M. L. (2021). Microbiota assessments for the identification and confirmation of slit defect-causing bacteria in milk and Cheddar cheese. *Msystems*, *6*(1), 10.1128/msystems. 01114-01120.

Yi, R., Tan, F., Liao, W., Wang, Q., Mu, J., Zhou, X., Yang, Z., & Zhao, X. (2019). Isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* HFY05 from natural fermented yak yogurt and its effect on alcoholic liver injury in mice. *Microorganisms*, *7*(11), 530.

Zafar mokhtarian, E., Rezazadeh Bari, M., & Amiri, S. (2018). Isolation and molecular identification of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from sheep milk and yogurt. *Journal of food science and technology(Iran)*, *15*(79), 243-252.

Isolation and molecular identification of *Lactobacillus plantarum* bacteria from traditional dairy products

Kazemimiraki M[1], Moazamian E[2*], Mokhtari MJ[3], Gholamzad M[4]

1. Ph.D. student, Department of Genetics, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
3. Department of Biology, Zarghan Branch, Islamic Azad University, Zarghan, Iran
4. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: elhammoazamian@gmail.com

Abstract:

Lactobacillus plantarum is an important bacterium in the food industry recognized as a useful and practical strain. The advantages of lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* species, are their potential probiotic properties and their ability to induce immune responses. This study investigated the isolation and identification of *Lactobacillus plantarum* from dairy products. 96 samples of traditional dairy products were collected from different regions of the Fars province. The samples were cultured on MRS agar media and their colony morphology and shape were investigated. Then, Gram staining and biochemical tests such as catalase, oxidase, sugar fermentation, and citrate utilization were performed to identify the biochemical characteristics of *Lactobacillus* species. Finally, using molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) targeting the 16S rRNA gene and sequencing the desired sequence, the genetic identification of *Lactobacillus* species was performed. Using diagnostic and biochemical methods, 11 *Lactobacillus* isolates were successfully isolated, and after polymerase chain reaction and sequencing, 4 isolates were confirmed as *Lactobacillus plantarum*. All 4 isolates were Gram-positive, catalase-negative, oxidase-negative, and citrate-negative, and they fermented glucose, mannose, sucrose, and sorbitol. The final diagnosis of this bacterium was confirmed by molecular identification and sequencing of the 16S rRNA gene. The results indicate the presence of *Lactobacillus plantarum* in dairy products and it is possible to isolate this important species from dairy products by examining the shape, biochemical and molecular methods. Furthermore, the use of the methods employed in this study as diagnostic indicators enables isolation of *Lactobacillus plantarum*.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, dairy products, molecular identification, biochemical tests.