جداسازی و شناسایی باکتری‌های مشابه با باکتری بیفیدوباکتریوم از غذای سنتی ترخینه و بررسی توانایی آن‌ها در کاهندگی سطح کلسترول و تری گلیسیرید در محیط آزمایشگاهی

نسیم افشار [۱]، کیومرث امینی [۲*]، حمید رضا مهاجرانی [۳]، ساسان ساکی [۴]

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
۲-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
۳- گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.
۴- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

*نویسنده مسئول: *dr_kumarss_amini@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

چکیده

جداسازی و شناسایی باکتری‌های دارای ویژگی های مفید از محصولات محلی می تواند در معرفی انواعی منحصر به فرد از پروبیوتیک ها نقش مهمی داشته باشد. این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی توانایی باکتری‌های بیفیدوباکتریوم جداسازی شده از غذای سنتی ترخینه در کاهندگی سطح کلسترول و تری‌گلیسیرید در محیط آزمایشگاهی انجام شده است. سویه های بومی بیفیدوباکتریوم از غذای محلی به نام ترخینه با استفاده از محیط کشت عمومی و اختصاصی جداسازی شده و براساس ویژگی های فنوتیپی، آزمونهای بیوشیمیایی استاندارد و بررسی توالی 16S rRNA شناسایی شدند. سپس نمونه های دارای خصوصیات پروبیوتیکی همچون مقاومت به اسید و صفرا از نظر حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین فعالیت کاهش کلسترول و تری گلیسیرید محیط کشت آنها به روش او-فتال‌آلدئید سنجیده شد. در طی این مطالعه تعداد ۲۱۰ باکتری از غذای ترخینه جداسازی شد که ۱۳ سویه مشابه بیفیدوباکتریوم در بین آنها وجود داشت و از بین آنها ۱۰ سویه دارای مقاومت نسبت به اسیدهای صفراوی و نمک بودند. بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک ها نشان داد که اغلب سویه ها حساس به آنتی بیوتیک های رایج بودند و سویه های S4 و S1 به ترتیب میزان کلسترول را در محیط کشت به میزان۰/۵۸±۷۵ و ۰/۱۳±۷۱ درصد کاهش دادند ($p<0.01$). در بین سویه ها، سویه S4 و S10 و S1 به ترتیب۰/۴۲±۶۵ درصد،۰/۷۴± ۶۳ و ۰/۱۳±۶۲ درصد میزان کاهش تری گلیسیرید را اعمال نمودند. داده های این مطالعه نشان داد که پروبیوتیک های جداسازی شده از غذای محلی ترخینه دارای پتانسیل جذب و کاهش کلسترول و تری گلیسیرید محیط کشت به میزان قابل توجه بوده‌اند.

کلید واژه ها: بیفیدوباکتریوم، پروبیوتیک، ترخینه، کلسترول.

مقدمه

بیماری های قلبی و عروقی مهمترین علل مرگ و میر در جوامع انسانی به شمار می روند و کلسترول بالای خون از مهمترین عوامل خطر ایجاد این دسته از بیماری ها محسوب می گردد (Benjamin et al., 2019) . مطالعات نشان داده اند که کاهش یک درصد از کلسترول خون میتواند منجر به کاهش ۳ درصدی بروز بیماری های قلبی و عروقی شود. امروزه استفاده از غذاهای فرا سودمند به منظور افزایش کیفیت زندگی جوامع انسانی بسیار متداول است. این دسته غذایی علاوه بر خواص تغذیه ای متعارف دارای ویژگی سلامت بخش برای مصرف کننده هستند و

فراتـر از ارزش تغذیـه ای دارای ارزش دارویـی بـوده و در کـاهش خطـر ابـتلا بـه بیماریهـای مـزمن تـاثیر گـذار هســتند(Granato et al., 2020). پروبیوتیک‌هــا از مهمترین اجزای تشکیل دهنده غـذاهای عملگـرا[1]هسـتند که اثرات آنها در زمینه رفع مشکلات گوارشی، بهبود علایم نشانگان روده تحریک پـذیر و کولیـت، کـاهش کلسـترول خـون و میـزان جـذب آنهـا از روده، تولیـد مولکول‌هـای پیچیده و ترکیباتی مانند ویتامین‌هـا و آنتی‌بیوتیـک هـای مختلف، کاهش شـانس ابـتلا بـه سـرطانهای روده، کبـد و پستان و کاهش بیماری زایـی بـاکتری هـای مضـر اثبـات گردیـده اسـت(Aguilar-Toalá et al., 2018). در حـال حاضر نسل جدیـد محصـولات لبنـی حـاوی فرآورده‌هـای پروبیوتیکی مختلف در جهان تولید و عرضه می‌شوند. انواع نوشیدنی‌های پروبیوتیک، شیر، انـواع پنیـر، دوغ و ماسـت نوشیدنی، ماست سفت یا هـم زده، بسـتنی، خامـه تـرش، شیر بدون چربی و نوشـیدنی‌های بـه دسـت آمـده از دوغ، کـره از جملـه ایـن محصـولات هسـتند (Birch and Bonwick, 2019). ماست یکی از محصولاتی است که به عنوان یک فراورده پروبیوتیک بـالقوه، توجـه زیـادی را بـه خود جلب کرده است. ماست پروبیوتیک عـلاوه بـر تـأمین باکتری‌های زنده، مواد مغذی با ارزشی هم چون کلسـیم و پپتیدهای بیولوژیک در اختیار بدن قرار می‌دهند. بـر ایـن اساس بازار ماست‌های پروبیوتیکی در سراسر جهـان رشـد زیـادی را نشـان می‌دهـد، بـه طـوری کـه بخـش قابـل ملاحظه‌ای از ماست‌های عرضه شـده حـاوی باکتری‌هـای پروبیوتیک اسـت(El-Saadony et al., 2021) . در بـین باکتری های پروبیوتیک، بیفیدوباکترها و لاکتوباسـیلوس‌ها از اهمیت فراوانی برخوردارند چرا که علاوه بر مقاومـت در مقابل اسید معده و صفرا دارای چسبندگی بـالا بـه مخـاط روده نیز هستند. در مطالعات اخیر نشان داده شـده اسـت که پروبیوتیک ها دارای اثرات کاهندگی کلسترول و چربی های خون می باشند و علاوه بر ایـن هزینـه هـا و عـوارض جانبی داروهای شیمیایی را به همـراه ندارنـد (Kerry et al., 2018). مکانیسـم هـای مولکـولی دقیـق کـاهش کلسترول تاکنون مشخص نگردیده اند اما اعتقـاد بـر ایـن است که جذب کلسـترول و تبـدیل یـا تجزیـه آن توسـط کلسـترول اکسـیدازها در بـاکتری هـا صـورت می‌گیـرد. همچنین نشان داده شده اسـت کـه کلسـترول مـی توانـد توسط باکتری ها از طریق اتصـال آن بـه پوشـش سـلولی باکتری و ادغام در لایه دوگانه فسفولیپیدی غشایی جـذب شود (Ma et al., 2019). علاوه بر این، فرضیه دیگر ایـن است که رسوب همزمان با نمک های صفراوی، و یا تبدیل بیوشیمیایی به کوپروستانول ممکن است بـه طـور مشـابه منجر به حذف کلسـترول شـوند (Sivamaruthi et al., 2019). ترخینه نوعی غذای تخمیری است کـه از دوغ یـا شـیر تخمیـر شـده بـه دسـت می‌آیـد و در اسـتان هـای کرمانشاه، لرسـتان، کردسـتان، ایـلام، مرکـزی، همـدان و آذربایجان غربی مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بـر ایـن ترخینـه در میـان کردهـای عـراق، ترکیـه و سـوریه، و همچنین در میان مردم ارمنی در ارمنسـتان و نیـز مـردم یونانی کشورهای یونان، قبرس، آلبانی، بلغارستان و برخـی مناطق عراق و مصر نیـز رواج دارد. از آنجـا کـه شناسـایی پروبیوتیک های محلی دارای پتانسـیل هـای مفیـد بـرای انسان از اهمیت فراوانی برخوردار است، این مطالعه بـر آن بوده است تا علاوه بـر جداسـازی باکتری‌هـای پروبیوتیـک بیفیدوباکتریوم از غذای محلی ترخینه در اسـتان لرسـتان در مرکز ایران، به بررسی تـاثیر آن بـر سـطح لیپیـدها در محیط کشت بپردازد.

مواد و روشها

جداسازی و شناسایی سویه ها در ایـن مطالعـه جداسـازی باکتری های پروبیوتیک از محصول بومی و محلـی بـه نـام ترخینه انجام شد کـه نـوعی افزودنـی در تهیـه سـوپ در نواحی کوهستانی غرب ایران اسـت. ایـن مـاده متشـکل از بلغور گندم است که در دوغ گوسفندی خیسـانده و ادویـه های مخصوص از قبیل فلفل، رازیانه ، زیره، زنجبیل و پونه و سایر گیاهان بومی بـه آن افـزوده مـی شـود. تعـداد ۳۰ نمونـه ترخینـه از منطقـه الیگـودرز لرسـتان جمـع آوری

[1] Functional food

گردید و پس آسیاب شدن و کد گذاری در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. جداسازی سویه های پروبیوتیک با کشت نمونه ها در Gas-pak در محیط کشت مایع De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (HiMedia, India) غنی شده با ال موپیروسین ۰/۰۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، در شرایط بی‌هوازی، ۱۰ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انجام گردید.

علاوه بر این از محیط کشت Transgalacto-Oligosaccharides (TOS, Honsha, Japan) به منظور جداسازی اختصاصی سویه های بیفیدوباکتریوم استفاده گردید. پس از بررسی رشد کلنی، شمارش کلنی صورت گرفت و یک لوپ از نمونه های دارای کدورت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس در محیط کشت MRS آگار و TOS کشت با شرایط بی هوازی (۳/۵ درصدCO_2، ۵ درصد O_2، ۷/۵ درصد H_2 ، ۸۴ درصد N_2) گردید. پس از دوره انکوباسیون کلنی های به دست آمده از نظر مورفولوژی کلنی بررسی شدند و تحت رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی همچون احیای نیترات، هیدرولیز ژلاتین، کاتالاز، اکسیداز، IMViC و رشد در نمک صفراوی ۲ درصد استاندارد قرار گرفتند. همچنین فعالیت همولیتیک سویه ها در انکوباسیون در محیط بلاد آگار غنی شده با ۷ درصد خون گوسفند در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت بررسی شد(Bunesova et al., 2014).

بررسی مولکولی

در این مطالعه بررسی توالی ژن 16S rRNA به منظور شناسایی دقیق سویه های جداسازی شده انجام گردید. ابتدا استخراج ژنوم سویه ها توسط کیت استخراج DNA اختصاصی باکتری (GenElute, Sigma) صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده توسط روش اسپکتروفتومتری (Nanodrop, Thermo Scientific) و الکتروفورز در ژل آگاروز ۲ درصد تایید گردید. تکثیر توالی 16S rRNA با استفاده از پرایمر های یونیورسال 5-27F AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 و 5-1492R GGTTACCTTGTTACGACTT-3 انجام گرفت. مقادیر مواد برای هر واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon, USA)، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ۴ میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در حضور کنترل منفی در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند و پس از رنگ آمیزی با اریتروژل توسط دستگاه ژل داک (MahamAzma, Iran) از آنها عکسبرداری شد. 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 MEGA7 به روش Neighbor-joining انجام گردید (Zhao et al., 2021).

بررسی میزان تحمل به شرایط اسیدی معده و نمک های صفراوی در سویه ها

به منظور بررسی مقاومت سویه های جداسازی شده به شرایط دستگاه گوارش، میزان تحمل آنها به اسید و نمک های صفراوی سنجیده شد. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی CFU/mL 108×1/5 سلول به لوله حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط

کشت MRS با pH=۲ و لوله کنترل حاوی محیط کشت MRS با pH=۷ اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. نهایتا یک میلی لیتر از هر لوله در محیط کشت MRS آگار تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در جار بی هوازی انکوبه گردید و سپس شمارش میکروارگانیسم ها طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۹۸۹۹ انجام شد. سویه های مقاوم به شرایط اسیدی وارد آزمون بررسی مقاومت به نمک های صفراوی شدند. بدین ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی CFU/mL ۱/۵×۱۰^۸ سلول به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع به عنوان کنترل و محیط کشت MRS حاوی ۰/۳ تا ۰/۷درصد بایل (Oxgall) اضافه شد. جذب نوری محیط ها 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 باکتری ها 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 نمونه ها در زمان صفر و۸ ساعت بعد از انکوباسیون است. ضریب بازدارندگی مساوی یا کمتر از۰/۴ نشان دهنده مقاومت سویه ها به نمک های صفراوی در نظر گرفته می شد(Kamalian et al., 2014).

بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ها

از روش کربی-باوئر (انتشار دیسک) برای سنجش تاثیر آنتی بیوتیک های کانامایسین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین(۱۰ میکروگرم)، تترا سایکلین(۳۰ میکروگرم) ، کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم) و پنی سیلین G (۱۰ میکروگرم) بر روی سویه های جداسازی شده استفاده شد. سویه ها در محیط کشت MRS مایع کشت شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس غلظت ده برابری از آنها در محلول فیزیولوژی پپتون تهیه شده و به پلیت های حاوی MRS آگار اضافه شد. سپس دیسک های آنتی بیوتیک در پلیت های تلقیح شده قرار داده شده و پس از انکوباسیون ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس اندازه هاله بازدارندگی سنجیده شد و باکتری های مورد مطالعه بر اساس جدول CLSI نسخه ۲۰۱۹ به گروه های مقاوم، متوسط و حساس طبقه بندی شدند (Talukder et al., 2021).

بررسی حذف کلسترول و تری گلیسیرید محیط کشت

به منظور بررسی پتانسیل حذف کلسترول در سویه های مقاوم به شرایط اسیدی و نمک های صفراوی میزان۰/۲ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی حاوی CFU/mL ۱/۵×۱۰^۸ سلول به ۲۰ میلی لیتر محیط کشت MRS حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کلسترول اگزالات تلقیح گردیده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید. از محیط کشت حاوی کلسترول اگزالات بدون تلقیح میکروارگانیسم ها به عنوان بلانک استفاده شد. پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون لوله ها در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و ۰/۵ میلی لیتر از سوپرناتانت به لوله شیشه ای منتقل شد. سپس ۳ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد و ۲ میلی لیتر هیدروکسید پتاسیم ۵۰ درصد به آن افزوده شده و با ورتکس به مدت یک دقیقه مخلوط شد. لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب ۶۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند و سپس در دمای اتاق سرد 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. سپس۲/۵ میلی لیتر از لایه رویی (هگزان) به لوله دیگری انتقال یافته و در حمام آب ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت تا هگزان تبخیر شود. نهایتا ۴ میلی لیتر o-phthalaldehyde به مایع باقی مانده در لوله اضافه میشد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون با ۲ میلی لیتر سولفوریک اسید مخلوط می گردید و پس از ۱۰

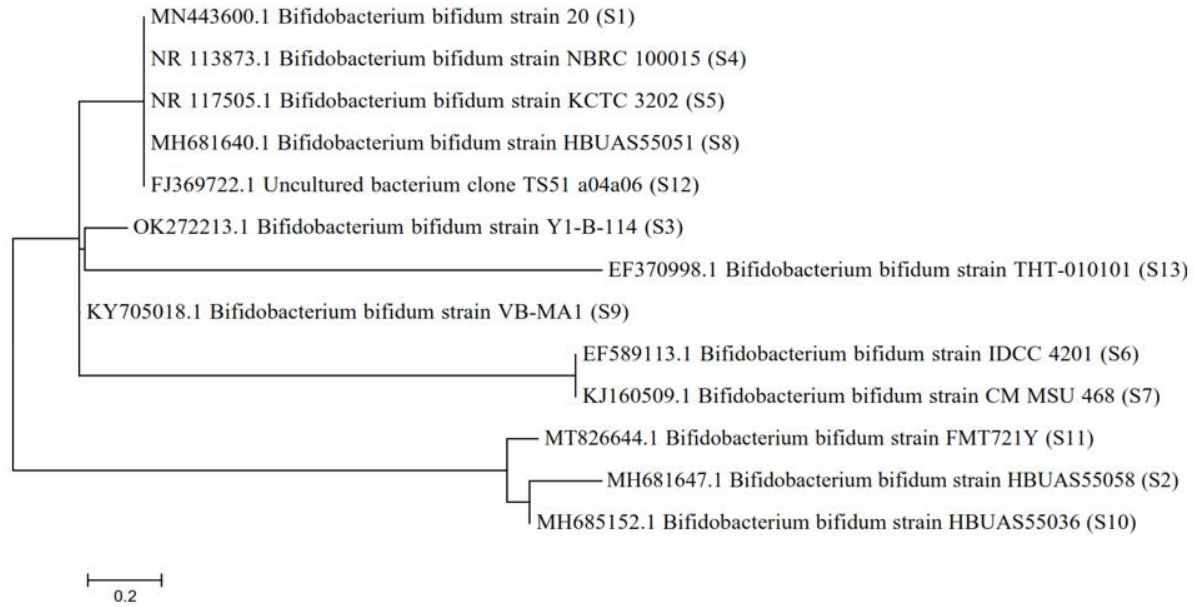
دقیقه جذب نمونه ها در ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری می شد (Shemshad et al., 2021).

بررسی اثر کاهندگی تری گلیسیرید در سویه هایی صورت گرفت که بیش از ۳۰ درصد کلسترول را کاهش می دادند. پس از کشت سویه ها در محیط کشت MRS حاوی ۳ درصد تری گلیسیرید که با توجه به مطالعه Gao و همکاران(Gao and Li, 2018) تهیه شده بود، آنها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند سپس میزان تری گلیسیرید سوپرناتانت بدون سلول با استفاده از کیت تری گلیسیرید در ۵۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. از نرم افزار SPSS version 2019 برای آنالیز آماری استفاده شد. از روش تی دو نمونه مستقل به منظور بررسی تفاوت بین دو گروه استفاده شد و $p<0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سویه ها

بررسی های بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم نشان داد که از ۳۰ نمونه ترخینه جمع آوری شده از ۳۰ روستای استان لرستان بیش از ۲۱۰ باکتری و مخمر جداسازی شد که از بین آنها ۱۳ سویه گرم مثبت، کاتالاز و اکسیداز منفی، دارای تست اکسیداتیو-تخمیری مثبت (OF)، مشکوک به بیفیدوباکتریوم جداسازی شده و به صورت S1-S13 نامگذاری گردیدند. بررسی قسمتی از توالی 16S rRNA نشان داد که تمامی سویه ها دارای تشابه ژنتیکی بیش از ۹۰ درصد با باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بوده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱- تخمین ارتباط فیلوژنتیک بین ۱۳ سویه جداسازی شده از غذای محلی ترخینه با استفاده از روش آماری UPGMA با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ تعیین شد. مدل جایگزینی حداکثر احتمال ترکیبی بود. اعداد مقادیر بوت استرپ به عنوان سطح اطمینان هستند.

مقاومت به اسید و صفرا

از مهمترین خصوصیات باکتری های پروبیوتیک تحمل اسیدیته معده و قابلیت عبور از آن است. غربالگری سویه های جداسازی شده در محیط با pH اسیدی در مدت زمان ۲ ساعت منجر به جداسازی ۱۰ سویه بیفیدوباکتریوم مقاوم به اسید از نمونه های ترخینه گردید. بررسی ها نشان داد که ۵ سویه (S2,S3,S13,S5, S11) دارای ۳۰ تا ۵۰ درصد بقا، ۳ سویه (S1,S7,S9) دارای ۵۰ تا ۷۵ درصد بقا و ۲ سویه (S4, S10) دارای ۷۵ تا

۱۰۰ بقا بودند. ۲ سویه دیگر در ۲ ساعت اول کشت حساسیت بسیاری به محیط اسیدی نشان دادند. در مرحله بعد ایزوله های جداسازی شده مقاوم به شرایط اسیدی، در شرایط نمک های صفراوی مورد انکوباسیون قرار گرفتند. داده ها نشان داد که تمامی سویه ها در میزان بایل ۰/۳ تا ۰/۵ درصد رشد نمودند. همچنین ۲ سویه (S4,S1) در شرایط۰/۷درصد نمک صفراوی در محیط کشت MRS رشد نشان دادند.

بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ها

از ۲۱۰ سویه جداسازی شده، ۱۳ سویه شناسایی شده به عنوان باکتری های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم مورد بررسی حساسیت به آنتی بیوتیک ها قرار گرفتند که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. داده ها نشان داد که یک سویه به ونکومایسین، یک سویه به کلرامفنیکل، یک سویه به پنی سیلین و یک سویه به کانامایسین مقاومت نشان داده اند اما در سایر موارد حساسیت به آنتی بیوتیک ها وجود داشته است.

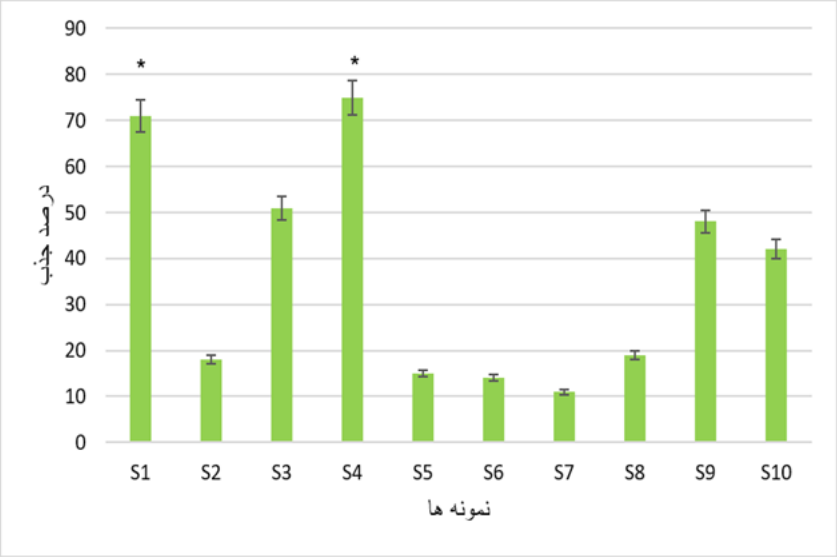
پتانسیل حذف کلسترول محیط کشت

پتانسیل حذف کلسترول از محیط کشت در ۱۰ سویه مقاوم به شرایط اسیدی و نمک های صفراوی بررسی گردید و نتایج نشان داد که سویه های S4 و S1 به ترتیب میزان کلسترول را در محیط کشت به میزان ۷۵±۰/۵۸ و ۷۱±۰/۱۳ درصد کاهش دادند ($p<0.01$). همچنین سویه های S10 , S9 ,S3 به ترتیب موجب کاهش کلسترول محیط کشت به میزان۵۱±۰/۸۴، ۴۸±۰/۹ و ۴۲±۰/۳۵ درصد شدند. سایر سویه ها منجر به کاهش کلسترول به میزان کمتر از ۲۰ درصد شدند. در بین سویه ها، سویه S4 و S10 و S1 به ترتیب ۶۵±۰/۴۲ درصد، ۶۳±۰/۷۴ و ۶۲±۰/۱۳ درصد میزان کاهش تری گلیسرید را اعمال نمودند در حالی که در سایر سویه ها میزان کاهش تری گلیسرید کمتر از ۲۰ درصد بود.

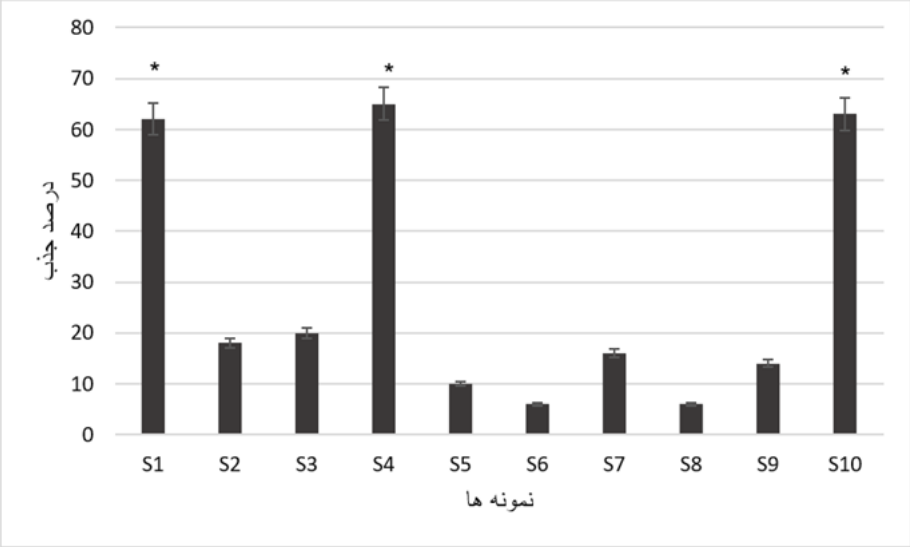
جدول ۱- حساسیت ایزوله های جداسازی شده در برابر آنتی بیوتیک های رایج با استفاده از روش انتشار دیسک

شماره سویه	کانامایسین ۳۰ میلی‌گرم	تتراسایکلین ۳۰ میلی‌گرم	اریترومایسین ۱۰ میلی‌گرم	پنی سیلین ۱۰ میلی‌گرم	کلرامفنیکل ۳۰ میلی‌گرم	ونکومایسین ۳۰ میلی‌گرم
S1	S	S	S	S	S	R
S2	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	I
S7	R	S	S	S	S	S
S8	S	S	S	R	S	S
S9	S	S	S	S	S	S
S10	I	S	S	S	S	S
S11	S	S	S	S	R	S
S12	S	S	I	S	S	I
S13	R	S	S	S	S	S

S: حساس به آنتی بیوتیک، R: مقاومت کامل به آنتی بیوتیک، I: مقاومت نسبی به آنتی بیوتیک



شکل ۲- درصد جذب کلسترول پس از طی دوره انکوباسیون در سویه های جداسازی شده از غذای محلی ترخینه. هر ستون نشان دهنده میانگین ±انحراف معیار ۳ آزمون مستقل است. $p<0.05$: *



شکل ۳- درصد جذب تری گلیسیرید محیط کشت پس از طی دوره انکوباسیون در سویه های جداسازی شده از غذای محلی ترخینه. هر ستون نشان دهنده میانگین ±انحراف معیار ۳ آزمون مستقل است.$p<0.05$: *

بحث

تاثیر پروبیوتیک‌ها بر سلامتی انسان در دهه های اخیر مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. همچنین تاکنون در مطالعات مختلف مکانیسم‌های مختلفی به منظور توصیف اثر کاهندگی کلسترول پروبیوتیک ها پیشنهاد شده است (Bhat and Bajaj, 2020). سویه های پروبیوتیک به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده غیربیماری زا اثرات سلامت بخش زیادی از جمله، نقش در تعدیل فاکتورهای لیپیدی از جمله لیپوپروتئین با دانسیته بالا و پایین ، کلسترول تام و تری گلیسیرید دارند. داده های حاصل از این تحقیق نشان داد که سویه های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* جدا سازی شده از غذای بومی ترخینه دارای خواص کاهندگی کلسترول و تری گلیسیرید بوده اند. بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ها نشان داد که علیرغم حساسیت اکثر سویه ها به آنتی بیوتیک‌ها، همچنان در برابر برخی از آنتی بیوتیک ها مقاومت وجود دارد که می

تواند به باکتری های دیگر منتقل شود از این رو این داده ها در تطابق با یافته های قبلی بر دقت در انتخاب باکتری پروبیوتیک تاکید می نماید (Kim et al., 2020; Majeed et al., 2019). مطالعات دیگر اثرات کاهندگی لیپیدی سویه های پروبیوتیک را اثبات نموده اند این مطالعه تحقیق دیگری در تایید نقش سویه های بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بومی ایران است.

با این وجود تنها برخی از گونه‌های پروبیوتیکی در بهبود فاکتورهای لیپیدی موثر شناخته شده اند. داده ها نشان داده اند که اثرات کاهش کلسترول سرمی پروبیوتیک ها بیشتر از طریق اثرات آن بر مسیرهای کلسترول- استرها و انتقال دهنده های لیپوپروتئینی است(Majeed et al., 2019). این مکانیسم ها شامل اتصال کلسترول به دیواره سلولی پروبیوتیک ها، برداشت و جذب کلسترول در روده توسط پروبیوتیک ها و حفظ یکپارچگی غشاهای سلولی، تبدیل کلسترول به کوپروستانول و دفع آن از طریق مدفوع (Wongrattanapipat et al., 2021)، تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه از جمله پروپیونات توسط باکتری های پروبیوتیکی که تولید کبدی کلسترول و یا برگشت کلسترول از پلاسما به کبد را مهار می کند(Fhoula et al., 2018) و نیز دکونژوگه شدن اسیدهای صفراوی از طریق اثر بر آنزیم هیدرولیز کننده نمک های صفراوی است. از آنجائی که کلسترول ماده اولیه جهت سنتز اسیدهای صفراوی است، استفاده از کلسترول برای سنتز اسیدهای صفراوی جدید، غلظت کلسترول در گردش خون را کاهش می دهد (Asan-Ozusaglam and Gunyakti, 2019).

محمدی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۹ به بررسی تأثیر پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس جدا شده از مدفوع گاو و گاومیش بر کاهش غلظت کلسترول در شرایط آزمایشگاهی پرداختند. در آن مطالعه توانایی باکتری های جداسازی شده از نمونه های مدفوع برای کاهش میزان کلسترول در محیط کشت مایع MRS سنجیده شد. بر اساس داده های آنها هیچ کدام از باکتری های لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه های مدفوع گاو نتوانستند تغییری در میزان کلسترول موجود در محیط کشت ایجاد نمایند. در حالیکه برخی از لاکتوباسیلوس های مدفوع گاومیش توانستند مقدار کلسترول موجود در محیط کشت را پس از ۲۴ ساعت کاهش دهند. این کاهش بسته به گونه باکتری متفاوت بوده و بیشترین آن مربوط به *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (۵۰ درصدکاهش) و کمترین آن مربوط به *لاکتوباسیلوس کازئی* (۱۲ درصد) بود (Tukmech et al, 2019). در مطالعه حاضر سویه های پروبیوتیک توانستند به میزان بیش از ۷۰ درصد کلسترول موجود در محیط کشت را کاهش دهند.

در مطالعات دیگر اثرات هیپولیپیدمیک گونه های متعدد پروبیوتیکی، اثبات گردیده است. الشافی و همکاران در مطالعه ای جامع اثرات کاهندگی کلسترول سرمی گونه های باکتریایی اسید لاکتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم NRRLB-۴۵۲۴*، به تنهایی یا در ترکیب با *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* را در موش‌های تغذیه شده با چربی و کلسترول بالا نشان دادند(El-Shafie et al., 2009). در بررسی دیگر شاهرستنی و همکاران در سال ۲۰۲۰ به بررسی بهبود اختلال در سطح چربی های خون و کاهش خطر ابتلا به بیماری های قلبی-عروقی با استفاده از پروبیوتیک بیوفلورا و عصاره دارچین در موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین پرداختند و نشان دادند که پروبیوتیک بیوفلورا سبب کاهش میزان تری گلیسرید، کلسترول و LDL-C سرمی خون شد. همچنین شاخص آتروژنی و مارکر التهابی hs-CRP در گروه های تیمار شده با پروبیوتیک، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل منفی و مثبت نشان داد. داده های آنها اثبات کرد که بیوفلورا با بهبود الگوی میکروبیوتای روده، کاهش قند خون و بهبود الگوی لیپیدی، به صورت موثری از اختلال در سطح چربی های خون ناشی از دیابت ممانعت می کند و در نتیجه خطر ابتلا به بیماری های قلبی-عروقی را کاهش می دهد(Shahrestan et al., 2020).

مطالعه حاضر در توافق با مطالعات ذکر شده نشان داد که جداسازی سویه های بومی دارای پتانسیل جذب و کاهش کلسترول و تری گلیسرید می تواند قدمی اولیه در جهت کشف سویه های پروبیوتیک موثر بر هایپر لیپیدمی و هایپر کلسترول می باشد. در تحقیق دیگری یورانگ و همکاران (Gao and Li, 2018) در سال ۲۰۱۸ به شناسایی باکتری های پروبیوتیک اسید لاکتیک کاهنده کلسترول و تری گلیسیرید پرداختند و نشان دادند که دو سویه جداسازی شده از غذای محلی چینی شامل یک سویه *انتروکوکوس فکالیس* و یک سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* توانایی کاهش کلسترول به میزان ۲۶ تا ۴۰ درصد و نیز کاهش تری گلیسیرید به میزان ۲۰ تا ۳۴ درصد را دارا بودند که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر پتانسیل کاهش چربی به مراتب کمتری را ارائه نموده است.

نتیجه گیری

داده های مطالعه حاضر نشان داد که سویه های جداسازی شده از غذای محلی ترخینه در محیط کشت دارای پتانسیل کاهش کلسترول و تری گلیسیرید محیط کشت به صورت قابل توجه بوده اند که آنها را از سایر مطالعات در این زمینه متمایز مینماید. علاوه بر این، سویه های دارای خواص جذب لیپیدها واجد ویژگی های پروبیوتیک همچون مقاومت به شرایط اسیدی و نمک های صفراوی و حساسیت به آنتی بیوتیک ها بوده اند که می تواند نشان دهنده پتانسیل آنها برای مطالعات بیشتر در این زمینه باشد.

منابع

1. Aguilar-Toalá J., Garcia-Varela, R., Garcia, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B., and Hernández-Mendoza, A. (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Trends in Food Science and Technology. 75105-114.
2. Asan-Ozusaglam, M., and Gunyakti, A. (2019). Lactobacillus fermentum strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects. Food science and biotechnology, 28(2): 501-509.
3. Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Chang, A. R., Cheng, S., and Das, S. R. (2019). Heart disease and stroke statistics—2019 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 139(10): e56-e528 .
4. Bhat, B., and Bajaj, B. K. (2020). Multifarious cholesterol lowering potential of lactic acid bacteria equipped with desired probiotic functional attributes. 3 Biotech. 10(5). 1-16 .
5. Birch, C. S., and Bonwick, G. A. (2019). Ensuring the future of functional foods. International Journal of Food Science and Technology. 54(5): 1467-1485 .
6. Bunesova, V., Killer, J., Vlkova, E., Musilova, S., Tomaska, M., Rada, V., and Kmet, V. (2014). Isolation and characterization of bifidobacteria from ovine cheese. International journal of food microbiology. 188: 26-30 .
7. El-Saadony, M. T., Alagawany, M., Patra, A. K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M. A., Dhama, K., and Abdel-Latif, H. M. (2021). The functionality of probiotics in aquaculture: an overview. Fish and Shellfish Immunology. 117: 36-52 .
8. El-Shafie, H. A., Yahia, N. I., Ali, H. A., Khalil, F. A., El-Kady, E. M., and Moustafa, Y. A. (2009). Hypocholesterolemic action of Lactobacillus plantarum NRRL-B-4524 and Lactobacillus paracasei in mice with hypercholesterolemia induced by diet. Aus J Basic Appl Sci. 3: 218-228 .
9. Fhoula, I., Rehaiem, A., Najjari, A., Usai, D., Boudabous, A., Sechi, L. A., and

Hadda-Imene, O. (2018). Functional probiotic assessment and in vivo cholesterol-lowering efficacy of Weissella sp. associated with arid lands living-hosts. BioMed research international. 2018.

10. Gao, Y., and Li, D. (2018). Screening of lactic acid bacteria with cholesterol-lowering and triglyceride-lowering activity in vitro and evaluation of probiotic function. Annals of microbiology. 68(9): 537-545.
11. Granato, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., and Putnik, P. (2020). Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. Annual Review of Food Science and Technology. 11: 93-118.
12. Kamalian ,N., Mirhosseini, H., Mustafa, S., and Abd Manap, M. Y. (2014). Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of Bifidobacterium pseudocatenulatum G4 in simulated gastrointestinal fluid. Carbohydrate polymers. 111: 700-706.
13. Kerry, R. G ,.Patra, J. K., Gouda, S., Park, Y., Shin, H.-S., and Das, G. (2018). Benefaction of probiotics for human health: A review. Journal of food and drug analysis, 26(3), 927-939.
14. Kim, E., Chang, H. C., and 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.
15. Ma, C., Zhang, S., Lu, J., Zhang, C., Pang, X., and 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.
16. Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., and Ali, F. (2019). Evaluation of the in vitro cholesterol-lowering activity of the probiotic strain Bacillus coagulans MTCC 5856. International Journal of Food Science and Technology. 54(1): 212-220.
17. Shahrestan, F., Jafari, P., Gharebaghi, A., Khani Farahani, I., and Shahrestan, E. (2020 .(Effect of Bioflora and Cinnamon Extract Consumption on Dyslipidemia and Cardiovascular Disease in a Diabetic Rat Model. Journal of Arak University of Medical Sciences. 23(2): 198-209.
18. Shemshad, N., Roozbeh Nasiraie, L., and Majidzadeh Heravi, R .(2021) .Isolation of Probiotic Lactobacilli Bacteria from Traditional Naein Dairy Product (Koome). Iranian Journal of Medical Microbiology. 15(1): 85-106.
19. Sivamaruthi, B. S., Kesika, P., and Chaiyasut, C. (2019). A mini-review of human studies on cholesterol-lowering properties of probiotics. Scientia Pharmaceutica. 87(4): 26.
20. Talukder, A., Haque, M., Mahmud, M., and Ekram, M. (2021). Molecular identification of Bifidobacterium sp. from local yoghurt and evaluation of growth inhibition activity against pathogenic bacteria. Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research. 56(3): 147-154.
21. TUKMECHI, A. In vitro evaluation of cholesterol lowering effects of isolated Lactobacillus probiotics from cattle and buffalo feces .
22. Wongrattanapipat, S., Chiracharoenchitta, A., Choowongwitthaya, B., Komsathorn, P., La-Ongkham, O., Nitisinprasert, S., Tunsagool, P., and Nakphaichit, M. (2021). Selection of potential probiotics with cholesterol-lowering properties for probiotic yoghurt production. Food Science and Technology International, 10820132211012252 .
23. Zhao, L., Xie, Q., Evivie, S. E., Liu, D., Dong, J., Ping, L., Liu, F., Li, B., and Huo, G. (2021). Bifidobacterium dentium N8 with potential probiotic characteristics prevents LPS-induced intestinal barrier injury by alleviating the inflammatory

response and regulating the tight junction in Caco-2 cell monolayers. Food and Function. 12(16): 7171-7184.

Isolation and identification of like Bifidobacterium bacteria from traditional Tarkhineh food and evaluation of their ability to lower cholesterol and triglyceride levels in vitro

Afshar N[1], Amini K[2]*, Mohajerani H[3]. Saki S[4]

1. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
3. Department of biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
4. Department of Medical Laboratory Sciences,Faculty of Medical Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University ,Arak,Iran.

***Corresponding author**: *dr_kumarss_amini@yahoo.com*

Received: 16 April 2022 Accepted: 23 July 2023

Abstract

Isolation and identification of bacteria with useful properties from local products can play an important role in introducing unique types of probiotics. The aim of this study was to isolate, identify and evaluation of the ability of Bifidobacterium bacteria isolated from Tarkhineh traditional food in lowering cholesterol and triglyceride levels of the culture medium. Native strains of Bifidobacterium were isolated from a local food called Tarkhineh using general and specific culture media and identified based on phenotypic characteristics, standard biochemical tests and 16S rRNA sequencing. Then, samples with probiotic properties such as resistance to acid and bile were examined in terms of sensitivity to common antibiotics. Cholesterol and triglyceride lowering activity of their culture medium was also measured by o-phthaldehyde method. During this study, 210 bacteria were isolated from Tarkhineh food, including 13 strains of like Bifidobacterium bacteria. Among them, 10 strains were resistant to acid and bile condition. Antibiotic susceptibility analysis showed that most strains were sensitive to common antibiotics and S4 and S1 strains reduced cholesterol in culture medium by 75 ± 0.58 and 71±0.13%, respectively (p<0.01). Among the strains, strains S4, S10 and S1 applied 65%, 63% and 62% reduction of the medium triglyceride, respectively. The data of this study showed that the probiotics isolated from the local food of Tarkhineh had the potential to absorb and reduce cholesterol and triglycerides of the culture medium to a significant extent. It seems that the potential of these strains to improve the lipid pattern can be further investigated.

Keywords: Bifidobacterium, Probiotics, Tarkhineh, Cholesterol.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.