فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد۱۴- شماره ۱- بهار ۱۳۹۸

مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک با ویژگی پروبیوتیک از ماست های سنتی شهرستان ورامین

فاطمه یعقوبی، سحر هنرمند جهرمی*، فهیمه باغبانی آرانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پیشوا، ورامین، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: sahar_hj2@yahoo.com

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه جامع تحقیقاتی دانشگاه شهید بهشتی

تاریخ دریافت: ۹۹/۱/۳ تاریخ پذیرش:۹۹/۲/۲۲

چکیده

استفاده از پروبیوتیک هایی مانند باکتری های اسید لاکتیک (LAB) برای تولید مواد غذایی ارزشمند یک روند پذیرفته شده جهانی است. محصولات لبنی ساخته شده از شیر خام تولید شده محلی با ویژگی های ذاتی مختلف آنها بخش مهمی از رژیم روزانه را تشکیل می دهند. این امر لبنیات را منبع غنی برای غربالگری LAB می کند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با ویژگی پروبیوتیک از ماست های سنتی شهرستان ورامین است. تعداد 32 نمونه ماست سنتی از شهرستان ورامین جمع آوری شدند و باکتری های اسید لاکتیک بر اساس تست های بیوشیمیایی جداسازی و شناسایی شدند. ویژگی پروبیوتیکی باکتری ها بر اساس تست تحمل اسید و تحمل املاح صفروای تعیین شد. پس از شناسایی مولکولی با روش PCR و تعیین توالی تعدادی از نمونه ها، باکتری های جداسازی شده در سطح جنس و گونه شناسایی شدند. تعداد ۹ عدد باکتری اسیدلاکتیک جداسازی و شناسایی شدند. ۷ جدایه باکتری اسید لاکتیک از نمونه ماست های گاوی و ۲ جدایه از ماست های گوسفندی جداسازی شد. خصوصیات مورفولوژی و بیوشیمیایی و توانایی تخمیر قندها توسط باکتریهای اسید لاکتیک جداسازی شده بررسی شد. از نظر تست تحمل اسید ۸ سویه مقاوم به اسید گزارش شدند و همه ۹ سویه نست به املاح صفراوی مقاومت نشان دادند. نتایج تعیین توالی سه ایزوله باکتریایی، وجود یک باکتری *Lactobacillus casei* و دو باکتری Enterococcus *faecium* را نشان داد. اغلب باکتری های اسیدلاکتیک جدا شده در این مطالعه دارای خواص پروبیوتیک بودند.

کلمات کلیدی: باکتری های اسید لاکتیک، ماست، پروبیوتیک، ورامین

مقدمه

محصولات لبنی از ارزش غذایی برخوردار هستند و هرگونه تأثیر مثبت آنها بر سلامت افراد در جوامع مدرن به عنوان یک مزیت محسوب می شود. استفاده از پروبیوتیک ها در غذا برای تولید مواد غذایی ارزشمند یک روند پذیرفته شده جهانی است (۱). پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که به دلیل توانایی انها برای تولید مواد مفید سلامتی و مغذی برای مصرف کننده با تعداد و روش مشخص به درون مواد غذایی وارد می شوند. پروبیوتیک ها مکمل های رژیم غذایی هستند که آثرات مثبت مفیدی در سیستم های گوارشی و ایمنی دارند. در سیستم گوارشی پروبیوتیک ها هضم غذا، جذب مواد مغذی، کاهش مقادیر کلسترول و

جلوگیری از رشد میکروارگانیسم های نامطلوب در مجاری گوارشی را تسهیل می کنند. سیستم ایمنی هم توسط پروبیوتیک ها تعدیل می شود به طوریکه کنترل واکنش های آلرژیک توسط آنها صورت می گیرد (۲). پروبیوتیک اکنون به طور گسترده ای در زمینه های مهندسی زیستی ، صنعتی و کشاورزی، ایمنی مواد غذایی و زندگی و بهداشت استفاده می شود. با توسعه سریع محصولات لبنی تخمیری، توسعه محصولات پروبیوتیک با عملکردهای فیزیولوژیکی بهتر به یک جهت مهم برای توسعه صنایع لبنی تبدیل شده است (۳).

باکتری های اسید لاکتیک در معده و روده و با توجه به ظرفیت جذب روده می توانند به عنوان پروبیوتیک های بالقوه برای توسعه بیشتر در آینده مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۴). باکتری های اسید لاکتیک (LAB[1]) یک گروه فراگیر از باکتری را تشکیل می دهند که در طبیعت گستردگی فراوانی دارند. آنها در مواد غذایی لبنیات، غذاهای تخمیری، گوشت، مواد غذایی با منشاء گیاهی، دستگاه گوارش و دستگاه ادراری انسان و حیوانات و نیز در خاک و آب وجود دارند (۵). این میکروارگانیسم ها به دلیل توانایی خود در تولید اسید لاکتیک به عنوان محصول نهایی متابولیسم بی هوازی و سنتز تعداد زیادی از متابولیت هایی که اثرات مفید تغذیه ای، حسی و ویژگی های تکنولوژیکی مواد غذایی تخمیری را دارند به خوبی شناخته شده هستند. به همین دلیل، LAB به طور وسیعی ۱) به عنوان کشت های استارتر، ۲) به عنوان پروبیوتیک ها و ۳) در تولید ترکیبات مورد توجه (مکمل های غذایی) به کار برده می شوند (۶،۷). باکتری های اسید لاکتیک (LAB) شامل تعدادی از جنس های باکتریایی در شاخه فیرمیکوتس ها هستند. اصلی ترین آنها جنس های *Enterococcus*، *Lactobacillus*، *Lactosphaera*، *Lactococcus*، *Leuconostoc*، *Melissococcus*، *Oenococcus*، *Pediococcus*، *Streptococcus*، *Tetragenococcus*، *Vagococcus* و *Weissella* هستند (۸،۹). باکتری های اسید لاکتیک دارای ویژگی های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مختلفی می باشند. از طرفی باکتری های اسید لاکتیک اثرات پیش گیری و درمان اسهال ناشی از مصرف آنتی بیوتیک ها، اسهال مسافرتی و سایر اشکال اسهال را دارد (۱۰،۱۱). همچنین مطالعات، اثر درمانی باکتری های اسید لاکتیک پروبیوتیکی را در برابر عفونت های واژینال، مجاری ادراری، پوست و زخم ها را نشان داده است (۱۲،۱۳). این اثرات ممکن است از طریق فاکتورهای مختلفی مانند تولید متابولیت های با فعالیت مستقیم ضدمیکروبی، رقابت با سایر ارگانیسم های پاتوژنیک جهت کسب مواد غذایی، تداخل با میکروارگانیسم های بیماریزا جهت جایگاه اتصال آنها بر روی سلول های اپی تلیال و ممانعت از تولید توکسین توسط گروه های بیماری زا یا سایر فعالیت های حفاظتی از طریق اثر تنظیمی سیستم ایمنی باشد (۱۴،۱۵).

محصولات لبنی ساخته شده از شیر خام تولید شده محلی با ویژگی های ذاتی مختلف آنها بخش مهمی از رژیم روزانه را تشکیل می دهند. تخمیر توسط LAB یک ویژگی مشترک در بین آنها است. این امر لبنیات را منبع غنی برای غربالگری LAB می کند (۱۶). سیموا و همکاران در بلغارستان و شریفی یزدی و همکاران در ایران گزارش دادند که ماست های سنتی منبع اصلی جداسازی این میکروارگانیسم های پروبیوتیکی را تشکیل می دهند (۱۷). در ایران تعداد محصولات لبنی رایج مورد مصرف زیاد هستند، ولی ماست یکی از مهمترین محصولات لبنی تخمیری گرفته شده از شیر است که بیشترین مصرف را دارد (۱۸). ماست یک ماده غذایی پروبیوتیک است، یعنی حاوی میکروب های زنده مفیدی است که وارد لوله گوارش می شوند و با جایگزینی در روده ها، این اندام را از وجود باکتری های بیماری زا محافظت می کنند و به عمل تخمیر ادامه می دهند و با تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، به سلامت سلول های روده کمک می کنند. ماست به هضم و جذب غذا نیز کمک می کند، زیرا اسید لاکتیک موجود در آن به جذب بهتر کلسیم کمک کرده و محیط مناسب بیولوژیکی را برای بهبود جذب کلسیم و ویتامین ها فراهم می آورد (۱۹). مطالعات تنوع میکروبی نیچ ها و محیط های ناشناخته منجر به جداسازی تعداد بی پایان گونه های جدید باکتریایی می شود که ممکن

[1] Lactic Acid Bacteria

است، ویژگی های خاص یا منحصر به فردی در حوزه فن آوری و یا سلامت داشته باشند (۲۰،۲۱).

مطالعه حاضر با هدف جداسازی باکتری های اسید لاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی از ماست سنتی شهرستان ورامین انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه گیری

این مطالعه از نوع توصیفی مقطعی بر روی نمونه های ماست سنتی از نوع گاوی (۲۸ عدد) و گوسفندی (۴ عدد) که از فروشگاه های لبنیاتی شهرستان ورامین به صورت تصادفی و در طی مدت ۳ماه از اردیبهشت تا مرداد ۱۳۹۷ جمع آوری شدند، انجام شد. نمونه ها جهت جداسازی و شناسایی در ظروف استریل درب دار و در کنار کیسه های حاوی یخ در دمای ۴ درجه به آزمایشگاه انتقال داده شدند. کدگذاری نمونه ها براساس نوع گونه حیوانی (گاوی و گوسفندی) انجام گرفته است. ۱ گرم از نمونه ماست جمع آوری شده در ۹ میلی لیتر آب پپتونه ۰/۱ درصد هموژنیزه شده، در شرایط استریل به صورت پورپلیت رقیق شده و در پلیت های حاوی محیط کشت جامد MRS (شرکت مرک، آلمان) و به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در شرایط بی هوازی (انکوباتور حاوی CO_2) و دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد.

جداسازی و خالص سازی باکتری های اسیدلاکتیک از ماست های سنتی

پس از پایان گرمخانه گذاری پلیت ها بررسی و کلنی های با مورفولوژی متفاوت از محیط جدا و خالص سازی شدند. کلنی های خالص سازی شده بر اساس تست های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مطابق با کتابچه باکتری شناسی سیستماتیک برجی[2] شناسایی شدند (۲۲). بر این اساس رنگ آمیزی گرم، تست های کاتالاز و اکسیداز و تست تولید آمونیاک از اسید آمینه آرژنین استفاده شد.

همچنین، به منظور تعیین بیشتر خصوصیات بیوشیمیایی باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده از ماست های سنتی شهرستان ورامین، رشد در حضور نمک کلرید سدیم ۶/۵ درصد جهت انجام تست تحمل نمک، رشد در دماهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، تست تحمل گرادیان pH ۲، ۴/۵ و ۵/۶ نیز انجام شد (جدول ۱) و تخمیر قندهای گلوکز، فروکتوز، مانوز، مانیتول، ساکارز، گالاکتوز، لاکتوز و سوربیتول بررسی شد (۲۳) (جدول ۲).

تعیین ویژگی های پروبیوتیک باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده

فعالیت تحمل اسید [3]

جهت انجام این آزمون از کشت باکتری های اسید لاکتیک جداسازی شده پس از سانتریفیوژ با دور 1,000 × g به مدت ۱۰ دقیقه، ۵ میکرولیتر جدا شد و در ۵ میلی لیتر بافر سالین استریل مجددا رقیق شد. سپس ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون آماده شده با ۹ میلی لیتر مایع ساخته شده اسید معده (0.2% NaCl, 0.35% pepsin, pH 3.0) مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نوسان ساز ترمواستاتیک[4] با دور ۳۰۰ g گرمخانه گذاری شد. پس از مدت ۰تا ۳ ساعت، بقاء ایزوله های باکتریایی تعیین شد. میزان بقاء باکتریایی از رابطه:

(CFU/mL) شمارش سلولی زنده پس از ۳ ساعت/(CFU/mL) شمارش سلولی در زمان ۰ ×100%

به دست آمد (۲۴).

فعالیت تحمل املاح صفراوی

جهت بررسی مقاومت به نمک های صفراوی، ابتدا باکتری های اسید لاکتیک جدا شده، به مدت۲۴ ساعت در محیط مایع MRS کشت داده شدند و ده میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۹ میلی لیتر محیط مایع MRS حاوی صفرای ۰/۳ درصد (oxgall) و محیط کشت مایع MRS فاقد صفرا (بعنوان کنترل) اضافه شد. محیط ها به

[2] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology
[3] Acid tolerance activity
[4] thermostatic oscillator

مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در شرایط بی‌هوازی (Co2 %5) گرمخانه گذاری شدند. جذب نوری محیط ها در ابتدا و پس از پایان گرمخانه گذاری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. با استفاده از فرمول استاندارد میکروارگانیسم های پروبیوتیک (مصوبه کمیته سیصد و چهل و ششم بیولوژی سازمان استاندارد ایران) ایزوله ها با ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۴ به عنوان مقاوم به صفرا شناسایی گردیدند (۲۵).

شناسایی مولکولی باکتری های اسیدلاکتیک

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومیک **(Gene Transfer Pioneers, Iran)** طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد و غلظت و خلوص DNA استخراج شده با دستگاه نانودراپ اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد.

به منظور شناسایی مولکولی از ژن *16SrRNA* با پرایمرهای یونیورسال و توالی های ۲۷۵`AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3`Forward:F و 5`AAGGTTACCTCACCGACTTC 3`Reverse:R ۱۴۹۵ استفاده شد (۲۶).

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱X بافر PCR (۱۰×)(شرکت سیناکلون، ایران)، ۲ میلی مولار MgCl2، ۰/۳ میلی مولار dNTP (شرکت سینا کلون، ایران)، ۱/۵ واحد آنزیم *Taq*DNA polymerase (شرکت سینا کلون، ایران)، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمر ها و ۱۰۰ نانوگرم DNA باکتریایی انجام گرفت. برنامه دمایی و زمانی PCR شامل مرحله واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله واسرشت ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه، مرحله اتصال ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه در ۳۰ سیکل و مرحله بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. جهت بررسی محصولات PCR نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال داده شده و بعد از رنگ آمیزی در دستگاه ژل داک مورد بررسی قرارگرفت. محصول ۳PCR جدایه بر روی ژل آگارز تخلیص شده و جهت تعیین توالی ارسال گردید. تعیین توالی در هر دو جهت رفت و برگشت و توسط BigDye terminator cycle sequencing (Applied Biosystems, (UK انجام شد. نتیجه با توالی موجود در داده های enBank با استفاده از BLAST مقایسه شدند.

نتایج

نتایج شناسایی و جداسازی باکتری های اسید لاکتیک

از نمونه های ماست سنتی مورد مطالعه از شهرستا ورامین، پس از کشت و جداسازی تعداد ۹ جدایه باکتری اسی لاکتیک جداسازی و شناسایی شدند. ۷ جدایه باکتری اسی لاکتیک از نمونه ماست های گاوی و ۲ جدایه از ماست ها گوسفندی جداسازی شد. از نظر خصوصیات ریخت شناس پرگنه های باکتری در محیط جامد MRS سفید، گرد و با لب و سطح صاف بود (شکل ۱-الف). مشاهده میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی گرم باکتری های میله ای گرم مثب (لاکتوباسیلوس) و باکتری های کوکسی گرم مثبت نشان دا (شکل ۱- ب).

بر اساس رنگ آمیزی گرم و نتایج تست های بیوشیمیای ۱ جدایه باکتری لاکتوباسیل (L1) و ۸ جدایه کوکسی (E1- E8) جدا سازی شد. همه ایزوله ها قادر به تخمیر قندها گلوکز، ساکارز، مالتوز، فروکتوز، سوربیتول و لاکتوز بودند. تن ایزوله های E3، E5 و E6 قادر به تخمیر قند سوربیتول نبودن

نتایج تست تحمل اسید

نتایج تست تحمل اسید باکتری های جداسازی شده نشا داد که ۸ جدایه از ۹ ایزوله باکتری اسید لاکتیک جداساز شده نسبت به اسید مقاوم هستند (جدول ۱).

نتایج تست تحمل املاح صفراوی

بعد از خوانش جذب نوری نمونه های کنترل و تست د زمان های و گرمخانه گذاری، ضریب بازدارندگی تمام سویه‌های اسید لاکتیک جدا سازی شده کمتر از ۰/۴ محاسب شد و نتایج نشان داد که همه ایزوله ها تحمل رشد نمک صفراوی را داشتند (جدول ۲).

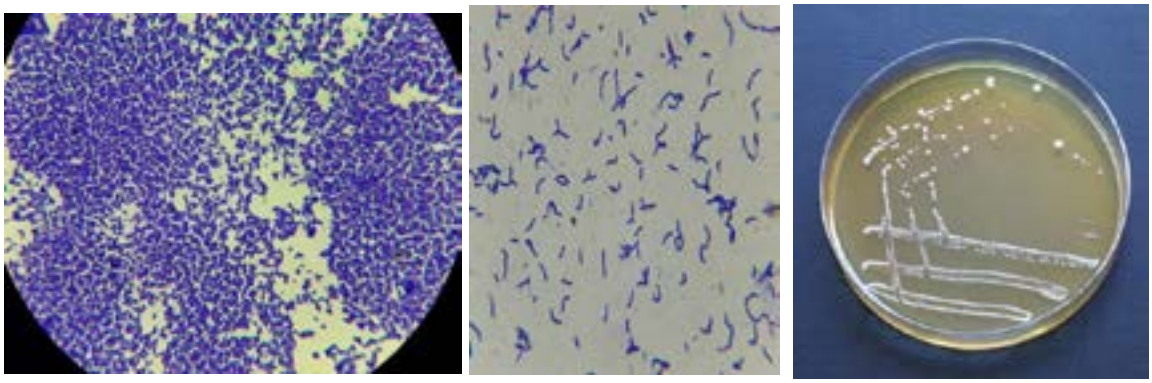
نتایج شناسایی مولکولی باکتری های اسید لاکتیک

تعیین توالی

پس از تکثیر توالی *16SrRNA* برای *16SrDNA* برای همه ۹ ایزوله ی شناسایی شده باکتری های اسید لاکتیک، محصولات PCR به صورت باند ۱۵۰۰جفت باز بر روی ژل آگاروز یک درصد مشاهده شد. تصویر الکتروفورز ژن *16SrRNA* در *16SrDNA* در شکل ۱ ارائه شده است.

برای تایید وجود باکتری و صحت سنجی نتایج PCR، ۳ نمونه از باکتریها به کد L1 ، E2 و E3 به صورت تصادفی برای توالی یابی ژن تکثیر شدند. نتایج توالی L1 نشان داد که باکتری استخراجی از لحاظ 16S rRNA به باکتری های زیر شبیه بودند: *Lactobacillus casei* strain MRTL4 16S ribosomal RNA gene با شباهت ۱۰۰٪، *Lactobacillus casei* strain SWU43268 16S ribosomal RNA gene با شباهت ۹۹/۹٪، *Lactobacillus casei* strain NG5 16S ribosomal RNA gene با شباهت ۹۹/۷٪، *Lactobacillus paracasei* strain CBA3611 chromosome با شباهت ۹۹/۸٪. نتایج بلاست توالی E1 نشان داد که باکتری استخراجی از لحاظ *16S rRNA* به باکتری های زیر شبیه بودند:

Enterococcus faecium strain 515 chromosome, complete genome با شباهت ۹۹٪، *Enterococcus faecium* strain N56454 chromosome, complete genome با شباهت ۹۹٪، *Enterococcus faecium* strain FB-1 chromosome, complete genome با شباهت ۹۹٪.



(الف) (ب) (ج)

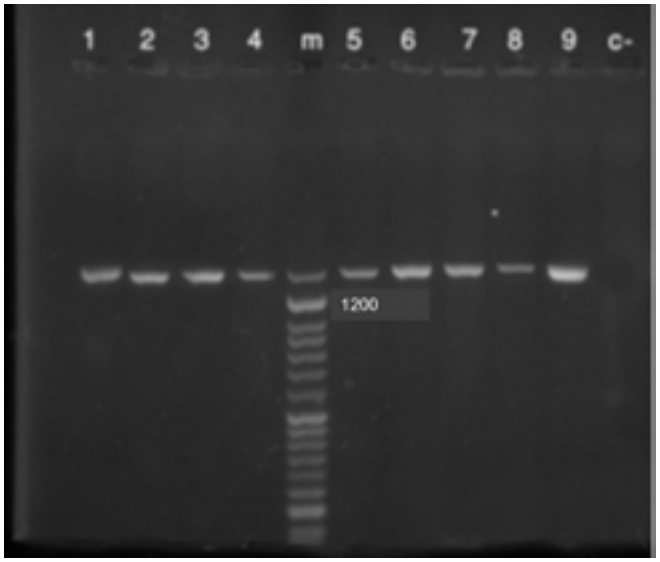
شکل ۱ - الف: مورفولوژی پرگنه های باکتری های اسید لاکنیک در محیط جامد MRS. ب: اشکال میله ای شکل لاکتوباسیلوس و ج: اشکال کوکسی گرم مثبت .میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ×۴۰.

جدول ۱ - نتایج تست فعالیت تحمل اسیدی باکتری های اسید لاکتیک جداشده از ماست های سنتی شهرستان ورامین.

فعالیت اسیدی	تحمل میزان بقاء سلولی (٪)	شمارش کلنی پس از ۳ ساعت(CFU/ml)	شمارش کلنی پس از ۰ ساعت(CFU/ml)	کد باکتری اسید لاکتیک
مقاوم	۷۲/۶	$۱/۶۷ \times 10^8$	$۲/۳ \times 10^8$	L1
مقاوم	۶۸/۸	$۱/۸۸ \times 10^8$	$۲/۷۳ \times 10^8$	E1
مقاوم	۶۹/۸	$۱/۷۶ \times 10^8$	$۲/۳۹ \times 10^8$	E2
مقاوم	۶۸/۰۵	$۱/۸۱ \times 10^8$	$۲/۶۶ \times 10^8$	E3
مقاوم	۷۹/۰۸	$۱/۸۹ \times 10^8$	$۲/۳۹ \times 10^8$	E4
مقاوم	۷۲/۸	$۱/۵۳ \times 10^8$	$۲/۱۰ \times 10^8$	E5
حساس	۳۵/۳۰	$۰/۷۸ \times 10^8$	$۲/۵۷ \times 10^8$	E6
مقاوم	۱/۶۸	$۱/۹۳ \times 10^8$	$۲/۸۳ \times 10^8$	E7

جدول ۲ - نتایج ضریب بازدارندگی جهت تعیین فعالیت تحمل املاح صفراوی باکتری های اسید لاکتیک جدا سازی شده از ماست های سنتی شهرستان ورامین.

کد نمونه	تست تحمل نمک صفراوی				
	نمونه تست در زمان صفر	نمونه کنترل در زمان صفر	نمونه تست پس از زمان گرمخانه گذاری	نمونه کنترل پس از زمان گرمخانه گذاری	ضریب بازدارندگی
L1	۰/۳۵۶	۰/۲۸۶	۰/۳۳۴	۰/۸۴	۰/۰۲۲
E1	۰/۳۶۶	۰/۲۸۹	۰/۳۳۵	۰/۲۵۴	۰/۰۳۱
E2	۰/۳۴	۰/۲۶۴	۰/۳۲۷	۰/۹۰۵	۰/۰۱۳
E3	۰/۳۴۳	۰/۲۵	۰/۳۲۲	۰/۸۷۸	۰/۰۲۱
E4	۰/۳۴۲	۰/۲۵۸	۰/۳۲۸	۰/۷۷۹	۰/۰۱۴
E5	۰/۳۴	۰/۲۷۶	۰/۳۲۴	۰/۸۶۶	۰/۰۱۶
E6	۰/۳۳۱	۰/۲۳۶	۰/۳۲۹	۰/۷۶۸	۰/۰۰۲
E7	۰/۳۴۴	۰/۲۶۵	۰/۳۲۹	۰/۹۳۹	۰/۰۱۵
E8	۰/۳۵۷	۰/۲۶۲	۰/۳۴۱	۰/۳۲۴	۰/۰۱۶



تصویر ۱- تصویر باندهای حاصل از تکثیر ژن *16srRNA*. چاهک های شماره 1 تا 9 حاوی ژن *16srRNA* به طول باند1500 . جفت باز. چاهک m سایز ماکر ۵۰ جفت بازی. چاهک نمونه کنترل منفی.

نتایج بلاست توالی E2 نشان داد که باکتری استخراجی از لحاظ *16S rRNA* به باکتری های زیر شبیه بودند: *Enterococcus faecium* strain SH 632 16S ribosomal RNA gene با شباهت ۹۷٪، *Enterococcus faecium* strain CFSAN059071 chromosome با شباهت ۹۷٪، *Enterococcus faecium* strain CFSAN059070 chromosome با شباهت ۹۷٪، *Enterococcus faecium* strain CFSAN059070 chromosome با شباهت ۹۷٪. به طور کلی نتایج تعیین توالی سه ایزوله باکتری اسید لاکتیک جدا شده نشان داد که یک مورد مربوط به باکتری

Lactobacillus casei و دو مورد دیگر مربوط به *Enterococcus faecium* بود.

بحث

طی دهه های اخیر، محققان توجه روز افزونی نسبت به مزایای سلامت گونه های میکروبی که در بدن جانوران یاز جمله انسانها زندگی می کنند، دارند (۲۷،۲۸). این گونه های میکروبی مفید در مجموع تحت عنوان پروبیوتیک نامیده می شوند. کاربرد سویه های خالص باکتری های اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک های جانوری ابزار مناسبی برای کنترل و پیشگیری از بیماری های جانوری می باشد (۲۹). ماست محصول لبنی تخمیری رایج در ایران است که یک منبع غنی تغذیه ای برای بسیاری از افراد جامعه می باشد. ماست از شیر خام گاو یا گوسفند تهیه می شود. بنابراین شیر خام به عنوان استارتر تهیه ماست های سنتی مورد استفاده قرار می گیرد. در این مطالعه با توجه به وجود ثابت ماست در رژیم غذایی ایرانیان و اینکه یک منبع اصلی برای پروبیوتیک ها است تنوع زیستی باکتری های اسید لاکتیک با ویژگی پروبیوتیکی در نمونه های ماست سنتی شهرستان ورامین مورد بررسی قرار گرفت. برخی از مطالعات نشان دادند که اغلب پروبیوتیک های مورد استفاده باکتری های اسید لاکتیک گونه لاکتوباسیلوس هستند (۳۰). Azadnia و همکاران سال ۲۰۰۹، پس از بررسی ماست نواحی مختلف شهرستان فارس ۱۱۷(۱۷/۳۸ درصد) گونه کوکسی شامل Lactococcus *lactis subsp. Cremoris*، *Leuconostoc mesenteroidessubsp. Cremoris* و ۵۵۶(۸۶/۶۲ درصد) گونه باسیلی شامل *Lactobacillus helveticus*، *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus casei* شناسایی کردند (۳۱). سال ۲۰۱۱، Ebrahimi و همکاران ۴ گونه مختلف *Lactobacillus* شامل *Lactobacillus casei*، *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus salivarius* و *Lactobacillus alimentaium* از ماست های سنتی شناسایی کردند. در آن مطالعه Pediococcus دارای پتانسیل خیلی خوبی برای پروبیوتیک بودن داشت (۳۲).

Iranmanesh و همکاران در سال ۲۰۱۲ از ۶۳ نمونه شامل شیر، ماست و کره محلی شهرستان میانه و هشرود (استان آذربایجان شرقی) ۷۷ ایزوله باکتری اسید لاکتیک شناسایی کردند (۳۳).

در مطالعه حاضر از بین ۳۳ نمونه ماست جمع آوری شده از شهرستان ورامین تنها ۹ ایزوله باکتری اسید لاکتیک بر اساس تست های مورفولوژی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. همه ایزوله ها قدرت تخمیر اغلب قندهای مورد مطالعه را داشتند. یک ایزوله باسیل و ۸ ایزوله کوکسی شناسایی شدند.

در سال ۲۰۱۷، یزدی شریف و همکاران ماست را به عنوان یک منبع غنی برای جداسازی باکتری های پروبیوتیک جهت استفاده در صنعت لبنی معرفی کردند (۱۸). از۹۶ نمونه ماست های سنتی با منشاء گاوی، گوسفندی ۸ ایزوله پروبیوتیک متعلق به گونه *Pediococcus acidilacticii* و ۶ ایزوله گونه های *Lactobacillus plantarum*، *L. brevis*، *L. fermentum* و *LKefiri* شناسایی شدند (۱۸).

یکی از مهمترین ویژگی های باکتری های اسید لاکتیک دارا بودن خصوصیات پروبیوتیکی آنها می باشد. دو تست تحمل نمک صفراوی و تحمل اسید جهت تعیین این ویژگی باکتری ها استفاده می شوند. در مطالعه Marhamatizadeha و همکاران سال ۲۰۱۹ از ۴۰ نمونه ماست تهیه شده از نواحی مختلف شهرستان بوشهر، در مجموع ۲ گونه ی *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus bulgaricus*، ۲ گونه ی *Lactobacillus delbrueckii* و ۲ گونه *Lactobacillus casei* شناسایی شد. در بین ایزوله ها، *Lactobacillus delbrueckii* و *Lactobacillus bulgaricus* به دست آمده از ناحیه ی بوشکان، فعالیت بیشتری در برابر املاح صفراوی نشان دادند (۳۴).

در مطالعه حاضر پس از انجام آزمون های مورد نظر بر روی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده، ۸ ایزوله به طور کامل دارای این ویژگی ها بودند و به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شدند. تنها یک ایزوله نسبت به اسید حساس گزارش شد. ایزوله های L1 باکتری اسید لاکتیک باسیلی و E3و E4 ایزوله های کوکسی دارای بیشترین میزان تحمل نسبت به اسید را داشتند. تفاوت در مقاومت نسبت به اسید بین باکتری‌های اسید لاکتیک مربوط به مکانیسم پمپ پروتونی،

مکانیسم واکنش تحمل و حفاظت از ماکرومولکول ها است. با این حال تنظیم کننده ها، تراکم سلولی و بیوفیلم می تواند این عامل را تحت تاثیر قرار دهد (۳۵). از طرفی وقتی پروبیوتیک ها وارد مجرای گوارشی می شوند، املاح صفراوی در روده کوچک مانع رشد آنها می شوند. بنابراین، قدرت تحمل ایزوله ها به این املاح از صفات مهم پروبیوتیک ها است (۳۵).

در مطالعه سلطان دلال و همکاران در سال ۱۳۹۴، از بین ۹۶ نمونه ماست جمع آوری شده از شهرستان یزد، بر تست های فنوتیپی و بیوشیمیایی ۴۷ باکتری اسید لاکتیک شناسایی شدند و از بین آنها ۱۲دارای ویژگی های تحمل اسید و نمک صفراوی بودند و به عنوان پروبیوتیک گزارش شدند. ۵ ایزوله کوکسی *Pediococcus acidilactis* و ۷ ایزوله *Lactobacillus* شامل گونه های *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus bravis*، *Lactobacillus fermentum* و *Lactobacillus kefiri* بودند (۲۵). در سال ۲۰۱۶، Wang و همکاران از بین ۶۶ نمونه ماست مورد مطالعه در مونگولیا، ۲۰۲ ایزوله باکتری اسید لاکتیک جداسازی کردند. آنها در ۴ جنس *Enterococcus*، *Lactococcus* ، *Lactobacillus* و *Leuconostoc* و ۲۱ گونه و زیرگونه تقسیم شدند. از بین این ایزوله ها، ۳۲/۱۸ درصد *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*، ۱۲/۳۸ درصد *Lactobacillus plantarum* و ۱۱/۳۹ درصد *Leuconosto mesenteroides* بودند. مطالعات آنها نشان داد که فراوانی ایزوله ها بسته به نوع نمونه از یک ناحیه با ناحیه دیگر متفاوت است. آنها گزارش دادند که ترکیب و تنوع باکتری های اسید لاکتیک موجود در محصولات لبنی تهیه شده از شیر می تواند به عنوان منبع مناسبی برای باکتری های پروبیوتیک باشد (۳۶). در این مطالعه پس از تکثیر ژن *16SrRNA* و تعیین توالی محصول PCR سه نمونه باکتری اسید لاکتیک با ویژگی پروبیوتیک شناسایی شده، ۱ گونه *Lactobacillus casei* و ۲ گونه*Enterococcus faecium* شناسایی شدند. انتروکوکوس های پروبیوتیک از محصولات لبنی مختلف و محصولات فراوری شده مانند سوسیس جدا شده اند (۳۷). جنس انتروکوکوس دارای گونه های بسیار زیادی است، اما گونه هایی که به عنوان پروبیوتیک مطالعه شدند، شامل*E.faecium*، *E. faecalis*، *E. lactis* و اخیرا *E. hirae* (۳۸) و *E. durans* (۳۹) است. انتروکوکوس ها بر خلاف سایر باکتری های اسید لاکتیک انتشار وسیع تری در طبیعت داشته و در برابر فاکتورهای بازدارنده رشد مثل اسیدیته، نمک، خشکی و حرارت و مواد شیمیایی ضدعفونی کننده از مقاومت بالایی برخوردارند (۴۰). در مطالعه حاضر اغلب ایزوله های اسید لاکتیک جداسازی شده دارای پتانسیل پروبیوتیک بوده یعنی از نظر تست تحمل نمک صفراوی و تحمل اسید جهت تعیین این ویژگی باکتریها مثبت تعیین شدند و می توانند در مطالعات بعدی جهت استفاده در مواد غذایی و دارویی مورد آزمایش قرار گیرند. بررسی مواد لبنی سنتی در مناطق و نواحی مختلف می تواند به جداسازی و شناسایی تعداد بیشتری از باکتریهای اسید لاکتیک که دارای خواص پروبیوتیک می باشند، کمک کند.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا می باشد.

منابع مورد استفاده

1. Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M. L., Shah, D., Jain, P., Saha, S. Prakash, S., 2014. Cholesterol assimilation by Lactobacillus probiotic bacteria: an in vitro investigation. Clin infect dis 46: S67–S72.
2. Granato, G., Branco, G.F., Nazzaro, F., Cruz, A.G., Faria, J.A., 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products. Compr Rev Food Sci Food Saf 9:292–302.
3. Wu, R., Wang, L., Wang, J., Li, H., Menghe, B., Wu, J., Guo, M., Zhang, H., 2009. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. J Basic Microbiol 49: 318-326.
4. Khalil, M. A., El-Sheekh, M. M., El-Adawi, H. I., El-Deeb, N. M., Hussein, M. Z., 2015. Efficacy of

microencapsulated lactic acid bacteria in Helicobater pylori eradication therapy. J Res Med Sci 20: 950-957.
5. Liu, W., Pang, H., Zhang, H., and Cai, Y., 2014. Biodiversity of lactic acid bacteria," in Lactic Acid Bacteria, eds H. Zhang, and Y. Cai (Dordrecht: Springer), 103–203.
6. Ruiz Rodríguez, L. G., Aller, K., Bru, E., De Vuyst, L., Hebert, E. M., Mozzi, F., 2017. Enhanced mannitol biosynthesis by the fruit origin strain Fructobacillus tropaeoli CRL2034.Appl. Microbiol. Biotechnol 101: 6165–6177.
7. Emerenini, E., Afolabi, O., Okolie, P., Akintokun, A., 2013. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from fresh fruits and vegetables using nested PCR analysis. Br Microbiol Res J 3: 368–377.
8. Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta , G., Coppola, S., 2001. Behavior of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in denaturing gradient gel electrophoresis. Curr Microbiol 42: 199-202.
9. Holzapfel, W. H., Habere,P., Geisen,R., Bjorkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. Am J Clin Nutr 73: 365S-373S.
10. Williams, N. T., 2010. Probiotics. Am J Health-Syst Pharm 67(6): 449-458.
11. Culligan, E. P., Hill, C., Sleator, R. D., 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. Gut Pathog 1: 19.
12. Al-Ghazzewi, F. H., Tester, R. F., 2010. Effect of konjac glucomannan hydrolysates and probiotics on the growth of the skin bacterium Propionibacterium acnes in vitro. Int J Cosmet Sci 32(2): 139-42.
13. Valdéz, J. C., Peral, M. C., Rachid, M., Santana, M., Perdigón, G., 2005. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. Clin Microbiol Infect 11(6): 472-9.
14. Oelschlaeger, T. A., 2010. Mechanisms of probiotic actions – A review. Int J Med Microbiol 300(1): 57-62.
15. Lebeer, S., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S. C.J., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. Microbiol Mol Biol Rev 72(4): 728-764.
16. Abd El Gawad, I., Abd El Fatah, A., Al Rubayyi, K., 2010. Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional rayeb milk in Egypt. J Am Sci 6: 728-735.
17. Simova, E., Beshkova, D., Dimitrov, Z. P., 2009. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. J Appl Microbiol 106: 692-701.
18. Sharifi Yazdi, M. K., Davoodabadi, A., Khesht Zarin, H. R., Tajabadi Ebrahimi, M., Soltan Dallal, M. M., 2017. Characterisation and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. Ital J Anim Sci 16: 7185-188.
19. Savaiano, D. A., 2014. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance. The American Journal of Clinical Nutrition 99(5): 1251S-5S.
20. Olofsson, T. C., Butler, È., Markowicz, P., Lindholm, C., Larsson, L., Vásquez, A., 2014. Lactic acid bacterial symbionts in honeybees–an unknown key to honey's antimicrobial and therapeutic activities. Int Wound J 13: 668-679.
21. Šalomskiene, J., Abraitiene, A., Jonkuviene, D., Măcioniene, I., Repčckiene, J., 2015. Selection of enhanced antimicrobial activity posing lactic acid bacteria characterised by (GTG)-PCR fingerprinting. J Food Sci Techno l52(7): 4124-4134.
22. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams, S. T., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th edition. Edited by Lippincott Williams and Wilkins. USA
23. Qian, Y., Long, X., Pan, Y., Li, X., Zhao, X., 2018. Isolation and identification of lactic acid bacteria (Lactobacillus plantarum YS2) from yak yogurt and its probiotic properties. Biomedical Research 29 (4): 815-820.
24. Chen, X. Y., Li, J., Zhao, X., Qian, Y., Chen, L. H., Chen, J., Suo, H. Y., 2015. In vitro screening of lactic acid bacteria with probiotic properties from traditional fermented Yak yogurt. Food Fermentat Ind 42: 85-90.
25. Soltan Dalal, M., Soltan Ebrahimi, M. M., Khesht, H., Taj abadi, M., Davood Abadi, A., Sadrabadi, A., Hakimian, M. M., Yazdi, A., 1394. Isolation and biochemical identification of potentially Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt in Yazd province. Yaz Behdasht Journal 54(Engilah).
26. Liu, W., Sun, Z., Zhang, J., Gao, W., Wang, W., Wu, L., Sun, T., Chen, W., Liu, X., and Zhang, H., 2009. Analysis of microbial composition in acid whey for dairy fan making in Yunnan by conventional method and 16S rRNA sequencing. Curr Microbiol 59: 199-205.
27. Blajman, J., Cristian, G., María, V. Z., Lorena, S., Diego, A., Ayelén, B., et al. 2015. In vitro and in vivo screening of native lactic acid bacteria

toward their selection as a probiotic in broiler chickens. Res Vet Sci 101: 50-6.
28. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., et al., 2014. The international scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 11: 506-14.
29. Tavakoli, M., Hamidi-Esfahani, Z., Hejazi, M. A., Azizi, M. H., Abbasi, S., 2017. Characterization of probiotic abilities of lactobacilli isolated from Iranian koozeh traditional cheese. Polish J Food Nutrition Sci 67(1): 1.
30. Fijan, S., 2014. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. Int J Environ Res Public Health 11: 4745-4767.
31. Azadnia, P., Khan Nazer, A. H., 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University 10(3): 28-34.
32. Ebrahimi, M. T., Ouwehand, A. C., Hejazi, M. A., Jafari, P., 2011. Traditional Iranian dairy products: a source of potential probiotic lactobacilli. African J Microbiol Res 5: 20-27.
33. Iranmanesh, M., Ezzatpanah, H., Mojgani, N., Karimi Torshizi, M. A., Aminafshar, M., Maoham, M., 2012. Isolation of lactic acid bacteria from ewe milk, traditional yoghurt and sour Buttermilk in Iran. European Journal of Food Research & Review 2(3): 79-92.
34. Marhamatizadeha, M. H., Sayyadi, S., 2019. Mining of lactic acid bacteria from traditional yogurt (Mast) of Iran for possible industrial probiotic use. Ital JANIM SCI 18(1): 663-667.
35. Pan, X. D., Chen, F. Q., Wu, T. X., 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of Lactobacillus acidophilus NIT. Food Control 20 (6): 598-602.
36. Wang, D., Liu, W., Ren, Y., De, L., Zhang, D., Yang, Y., Bao, Q. H., Mengh, Z., 2016. Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria from traditional dairy products in Baotou and Bayannur of Midwestern Inner Mongolia and q-PCR analysis of predominant species. Korean J Food Sci An 36(4): 499-507.
37. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Intern J Food Microbiol 41(2): 103-125.
38. Adnan, M., Patel, M., Hadi, S., 2017. Functional and health promoting inherent attributes of Enterococcus hirae F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the fresh water fish Catla catla. Peer J 5: e3085.
39. Li, B., Zhan, M., Evivie, S. E., Jin, D., Zhao, L., Chowdhury, S., et al. 2018. Evaluating the safety of potential probiotic *Enterococcus durans* KLDS6.0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study. Front Microbiol 29: 1943.
40. Franz, C. M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W., Gálvez, A., 2011. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. Int J Food Microbiol 151(2): 125-40.