جداسازی باکتری *Enterococcus* sp. 7C37 با توانمندی پروبیوتیکی بالا از پنیر قاینی به عنوان یک محصول تخمیری لبنی در استان خراسان جنوبی

سارا طالبی، علی مخدومی* و معصومه بحرینی

ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

پروبیوتیکها میکروارگانیسمهایی با اثرات مفید بر سلامت انسان هستند. جداسازی باکتریهای جدید با توانمندی پروبیوتیکی موجب گسترش کارایی این گروه از میکروارگانیسمها در سلامت انسان و حیوانات می گردد. هدف مطالعه حاضر جداسازی و ارزیابی توانمندی پروبیوتیکی باکتریهای به دست آمده از پنیر قاینی در استان خراسان جنوبی است. صفات پروبیوتیکی شامل: مقاومت به اسید، مقاومت به صفرا، حساسیت به آنتی بیوتیک ، مهار رشد باکتریهای بیماری زا، آب گریزی سطحی، خودتجمعی و آنتی اکسیدانی در جدایه های منتخب به دست آمده از این پنیر سنتی ارزیابی شد. از ۹۶ جدایه باکتری به دست آمده ۳۰ جدایه متفاوت جهت ارزیابی صفات پروبیوتیکی انتخاب شدند. از این تعداد ۵ جدایه قادر به رشد پس از ۲ ساعت نگهداری در شرایط اسیدی (pH=۲) و تحمل صفرا بوده و مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند. به غیر از مقاومت یک جدایه به کلرآمفنیکل بقیه جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای به کار برده شده حساس بودند. بیشترین اثر ضد میکروبی این جدایه ها بر علیه باکتری *E. coli* و *Bacillus subtilis* بود. جدایه 7C37 متعلق به جنس *Enterococcus* با ۸۸ درصد تحمل اسید، ۴۴ دقیقه تأخیر رشد در حضور صفرا، حساسیت نسبت به تمامی آنتی بیوتیکها، اثر ضد میکروبی بر علیه سه باکتری بیماری زا، ۱۸/۹ درصد قدرت خودتجمعی، ۸۱/۵ درصد آب گریزی سطحی و ۳۸ درصد فعالیت آنتی اکسیدانی در مجموع بیشترین توانمندی پروبیوتیکی را دارا بود. باکتریهای به دست آمده از این پنیرسنتی با دارا بودن صفات لازم می توانند به عنوان انواع پروبیوتیک مورد توجه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: انتروکوکوس، پروبیوتیک، پنیر قاینی، غذای تخمیری

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۵۱۳۸۸۰۵۵۱۸، پست الکترونیکی: a.makhdomi@um.ac.ir

مقدمه

واژه پروبیوتیک (برای حیات) اولین بار در سال ۱۹۵۴ به هنگام مقایسه اثر آنتی بیوتیکها با ترکیبات دارای عمل مطلوب بر میکروارگانیسمهای دستگاه گوارش و در مقابل لفظ آنتی بیوتیک (ضد حیات) به کار برده شد (۲۱). سازمان بهداشت جهانی پروبیوتیکها را این گونه معرفی کرده است: میکروارگانیسمهای زنده که به دنبال تجویز به میزان کافی مزایای سلامت برای میزبان به همراه دارند (۹). با مطالعه در مدلهای انسانی و حیوانی نقش پروبیوتیکها در درمان اسهال، کاهش عدم تحمل لاکتوز، کاهش عوارض بعد از عمل، اثرات ضد میکروبی، تأثیر در درمان سرطان روده بزرگ و کاهش علایم روده تحریک پذیر اثبات شده است(۱۰). همچنین امروزه با در نظر گرفتن محور روده – مغز به تأثیر پروبیوتیکها بر صفات ذهنی و خلقی اشاره می شود(۱۷). صفات لازم برای یک میکروارگانیسم پروبیوتیک عبارت اند از: ۱) باید به عنوان میکروارگانیسم ایمن شناخته شده باشد. ۲) باید توانایی تحمل بالایی نسبت به

شرایط اسیدی و نمک صفراوی داشته باشد. ۳) باید قادر به اتصال به سلولهای جدار روده باشد. ۴) باید توانایی مهار رشد باکتریهای بیماری زای گوارشی را دارا باشد. ۵) باید مقاومت آنتی بیوتیکی بالا نداشته باشد(۸). امروزه باکتریهای مختلفی با دارا بودن ویژگیهای فوق به عنوان انواع واجد توانمندی پروبیوتیکی شناسایی شده اند. اعضای جنس های *Lactobacillus*، *Bifidobacteria*، *Pediococcus*، *Enterococcus* ، *Bacillus* و همچنین مخمر *Saccharomyces boulardii* به عنوان میکروارگانیسمهایی با توانمندی پروبیوتیکی شناخته می شوند (۲۰). پروبیوتیکها از منابع مختلف مانند دستگاه گوارش انسان، غذا های تخمیری لبنی، غذاهای تخمیری غیر لبنی و انواع آب میوه ها قابل جداسازی هستند(۲۰). یکی از منابع مهم برای جداسازی میکروارگانیسمهایی با خواص پروبیوتیک غذاهای تخمیری است. تخمیر، یکی از روشهای بیوتکنولوژی قدیمی برای تولید محصولات غذایی با خصوصیات بهتر مانند ماندگاری بالا و طعم مطلوب است. حاصل نهایی تخمیر معمولاً دارای جمعیت میکروبی بهبود یافته، ایمن و با مواد مغذی غنی شده است که می تواند در دمای محیط نگهداری گردد. از میان غذاهای تخمیری محصولات لبنی منبع مهمی برای به دست آوردن میکروارگانیسمهای پروبیوتیک است.

بیشتر مطالعات در شناسایی سویه های پروبیوتیک به باکتریهای جنس لاکتوباسیلوس متمرکز شده است (۸). با این وجود توانمندی پروبیوتیکی جنس های دیگر مانند انتروکوکها به خوبی مشخص شده است . انتروکوکها باکتریهای کروی گرم مثبت در گروه باکتریهای اسید لاکتیک بوده و در تخمیر مواد غذایی نقش مهمی دارند. نقش آنها در رسیدن و ایجاد ترکیبات معطر در پنیر و سوسیس های تخمیری نشان داده شده است (۱۸). در رابطه با جداسازی سویه های با توانمندی پروبیوتیکی از پنیر های تولید شده با روشهای سنتی در ایتالیا (۷)، آرژانتین (۲۲) و بلغارستان (۱۱) گزارشهای متعددی موجود است. استانهای خراسان با تنوع اقلیمی و فرهنگی یک از ذخایر مهم در تنوع غذاهای تخمیری است. در این پژوهش پنیر سنتی قاینی با مصرف فراوان در جنوب خراسان برای جداسازی جدایه های با توانمندی پروبیوتیکی مورد توجه قرار گرفته است. توانمندی میکروارگانیسمهای به دست آمده از نظر ویژگیهای متعدد لازم برای یک سویه پروبیوتیک ارزیابی شده است.

مواد و روشها

جمع آوری نمونه: پنیر قاینی از مناطق روستایی شهرستان قاین در استان خراسان جنوبی جمع آوری گردید. نمونه پنیر در ظروف استریل و سرما به آزمایشگاه منتقل شده و در کمتر از ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی باکتریها: نمونه پنیر جمع آوری شده به میزان یک گرم در ۹ میلی لیتر آب نمک استریل ۱ درصد یکنواخت و با استفاده ازآب نمک ۱ درصد سری رقت تا رقت $۱۰^{-۵}$ تهیه و در محیطهای کشت نوترینت آگار و ام آر اس با درصد نمکهای صفر، ۳ و ۱۰ و با pH ۶/۵ و ۷/۵ تلقیح گردید. از آنتی بیوتیک سیکلوهگزامید (۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر) جهت جلوگیری از رشد قارچها در محیط جداسازی استفاده شد. پلیتها به مدت حداکثر یک ماه در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پلیتها روزانه مورد بررسی قرار گرفته و ضمن شمارش تعداد کلنیها، جدایه های به دست آمده به محیط جدید منتقل و تا به دست آوردن کشت خالص عمل کشت تکرار گردید. جدایه های به دست آمده در محیط کشت شیب دار نوترینت آگار در ۴ درجه سانتی گراد برای کوتاه مدت و محیط مایع نوترینت براث به همراه ۳۰ درصد گلیسرول در۸۰- درجه سانتی گراد جهت زمان طولانی نگهداری شدند.

ارزیابی توانمندی پروبیوتیکی جدایه ها: برای تعیین خصوصیات پروبیوتیکی، جدایه های متفاوت بر اساس

مورفولوژی، رنگ و شکل کلنی انتخاب و آزمونهای زیر برای این جدایه ها انجام گرفت.

مقاومت به اسید: از غلظت معادل نیم مک فارلند($۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد ایجاد کننده کلنی در هر میلی لیتر) کشت شبانه جدایه ها به میزان ۱ درصد به بافر فسفات نمکی (۲/۵ =pH)تلقیح و به مدت ۲ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از این مدت نمونه ها بر روی محیط نوترینت آگار تلقیح و بعداز ۲۴ ساعت گرماگذاری تعداد کلنیها شمارش شد. درصد زنده مانی براساس رابطه زیر تعیین گردید(۲۳):

$$\text{میزان زنده مانی (٪)} = \frac{\log A_t}{\log A_0}\times 100$$

A_0 ، تعداد کلنیهای اولیه در زمان صفر و A_t ، تعداد کلنی بعد از ۲ ساعت تیمار در شرایط اسیدی است.

مقاومت به نمک صفرا: از کشت مایع ۲۴ ساعته جدایه ها به میزان ۵ درصد به دو محیط مایع نوتریت براث حاوی ۰/۳ درصد نمک صفرا و محیط شاهد بدون صفرا تلقیح شد. محیط کشت درون گرمخانه ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفت و در فواصل یک ساعته رشد جدایه ها با اندازه گیری جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر مشخص شد. زمان رسیدن به جذب ۰/۳ واحد در هر دو نمونه شاهد و تیمار تعیین و اختلاف زمان بر اساس دقیقه بین دو محیط برای رسیدن به این جذب تعیین شد. جدایه هایی با اختلاف زمانی کمتر از ۶۰ دقیقه به عنوان انواع مقاوم به صفرا گزارش شدند (۱۶).

تست حساسیت به آنتی بیوتیک: به منظور ارزیابی حساسیت جدایه های منتخب به آنتی بیوتیکها از آزمون آنتی بیوگرام استفاده شد. غلظت معادل نیم مک فارلند جدایه ها بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت و دیسک آنتی بیوتیکهای مورد استفاده شامل(میکروگرم بر دیسک): اریترومایسین (۱۵)، تتراسایکلین «۳۰»، ریفامپیسین (۵)، متی سیلین (۵)، کانامایسین «۳۰»، کلرامفنیکل «۳۰» و آمپی سیلین (۱۰) برروی محیط کشت قرار گرفت و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد با استفاده از جدول استاندارد مؤسسه استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی و تعیین قطر هاله عدم رشد، جدایه ها به حساس، نیمه حساس و مقاوم طبقه بندی شده اند (۶).

فعالیت ضد میکروبی: برای ارزیابی توانایی مهار رشد باکتریهای بیماری زا توسط جدایه ها از روش کشت تقاطعی استفاده شد (۴). به این منظور ابتدا جدایه های پروبیوتیک در محیط مولر هینتون آگار به صورت خطی کشت و در درمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس باکتریهای بیماری زای مورد استفاده شامل *Escherichia coli* PTCC1399، *Bacillus cereus* PTCC1665، *Staphylococcus aureus* PTCC1431، *Bacillus subtilis* PTCC1365، *Pseudomonas aeruginosa* PTCC1047 و *Klebsiella pneumoniae* (سویه بیمارستانی) به صورت عمود بر خط رشد جدایه های پروبیوتیک کشت و پلیتها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نتایج بر اساس ایجاد هاله عدم رشد سویه های بیماری زا ثبت گردید.

ارزیابی خودتجمعی: از کشت مایع ۲۴ ساعته هر جدایه در محیط نوترینت براث، ۵ میلی لیتر به لوله آزمایش منتقل و به خوبی مخلوط شد. بلافاصله جذب نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت و سپس این لوله ها به مدت سه ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان جذب محلول رویی مجدداً در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. قدرت خود تجمعی با استفاده از رابطه زیر محاسبه و جدایه های با نتیجه بالای ۱۰ درصد به عنوان جدایه های دارای قدرت خودتجمعی در نظر گرفته شدند(۳).

$$\text{خود تجمعی (٪)} = 1-(\frac{X_2}{X_1})\times 100$$

در معادله فوق، X_1 جذب اولیه و X_2 جذب بعد از گذشت سه ساعت است.

فعالیت آب گریزی سطحی: ابتدا از هر جدایه کشت ۲۴ ساعته در محیط مایع نوتریت براث تهیه و سپس با استفاده از سانتریفیوژ، در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با دور ۶۰۰۰ در دقیقه و در طی زمان ۱۰ دقیقه، سلولهای باکتری جدا شد. رسوب به دست آمده دو بار با محلول بافر نمکی فسفات در pH خنثی شستشو شد. رسوب باکتری در محلول نیترات پتاسیم ۰/۱ مولار حل و سوسپانسیون میکروبی با جذب ۰/۲ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه گردید. پس از آن سوسپانسیون به دست آمده با نسبت ۱:۱ با کلروفرم مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفت تا محلول دو فازی به دست آمد. جذب فاز آبی بعد از گذشت این زمان ثبت گردید. میزان آب گریزی بر اساس رابطه زیر تعیین و جدایه هایی با فعالیت آب گریزی بالای ۵۰ درصد به عنوان جدایه های با ویژگی آب گریزی سطحی انتخاب شدند (۱۹).

$$\text{درصد آبگریزی} = 1-(\frac{X_2}{X_1})\times 100$$

در این معادله، X_1 جذب سوسپانسیون باکتری در پتاسیم نیترات و X_2، جذب محلول بعد از مخلوط شدن و ایجاد دو فاز آلی-آبی است.

فعالیت آنتی اکسیدانی: کشت ۲۴ ساعته جدایه ها در محیط مایع نوتریت براث تهیه و به منظور به دست آوردن عصاره سلولی، نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در حمام سونیکاتور قرار گرفت. نمونه ها دردمای ۴ درجه سانتی گراد و ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جمع آوری شد. برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدان از دی فنیل پیکریل هیدرازیل استفاده شد. ۲ میلی لیتر از محلول دی فنیل (۶ میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر متانول) به ۱۰۰ میکرولیتر مایع به دست آمده از سانتریفیوژ اضافه شد. به عنوان کنترل از ۲ میلی لیتر محلول دی فنیل حل شده در ۲ میلی لیتر متانول استفاده شد. لوله ها به خوبی ورتکس شدند و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. بعد از گذشت این مدت جذب هر نمونه در ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. با استفاده از رابطه زیر میزان فعالیت آنتی اکسیدانی هر جدایه مشخص گردید (۳).

$$\text{فعالیت آنتی اکسیدانی}(\%) = [\frac{(A_{control}-A_{rest})}{A_{control}}]\times 100$$

شناسایی جدایه ها: شناسایی جدایه های منتخب با روش مولکولی انجام شد. استخراج DNA ژنومی جدایه ها، از کشت تازه و خالص با استفاده از کیت تجاری (سیناژن) و طبق دستور العمل آن انجام شد. شناسایی باکتریها، با تکثیر و تعیین توالی ژن 16S rRNA با آغازگرهای عمومی 27F و 1492R انجام گردید(۱۴). محصول تکثیر DNA جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن (کره جنوبی) ارسال گردید. قرابت فیلوژنتیکی جدایه های به دست آمده با یکدیگر و با سویه های موجود در پایگاههای اطلاعاتی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

در این مطالعه پتانسیل پروبیوتیکی باکتریهای به دست آمده از پنیر قاینی ارزیابی گردیده است. پنیر قاینی متعلق به استان خراسان جنوبی بوده که برای تهیه آن از شیر تازه گوسفند و گاو استفاده می شود و دوره رسیدگی پنیر درون مشک می باشد. ۹۶ جدایه با تلقیح نمونه پنیر بر روی محیطهای کشت مورد استفاده به دست آمد. از این تعداد ۵۹ جدایه میله ای شکل و ۳۷ جدایه کروی و تمامی آنها گرم مثبت بودند. تعداد ۳۰ جدایه متفاوت براساس صفاتی مانند شکل میکروسکوپی؛ شکل، رنگ و فرم کلنی؛ کاتالاز و اکسیداز برای مرحله تعیین ویژگیهای پروبیوتیکی انتخاب شدند.

مقاومت به اسید و صفرا: از میان ۳۰ جدایه مورد بررسی ۶ جدایه 2737C، 1337C ، 7C37، 1430BM، 630E وD230 قادر به بقاء در شرایط اسیدی با توان متفاوت

بودند (جدول ۱). جدایه 7C37 با ۸۸ درصد بقاء پس از ۲ ساعت تیمار در شرایط اسیدی (pH = ۲/۵) مقاوم ترین و جدایه 1430BM با ۶۹ درصد حساس ترین جدایه بوده است. شش جدایه تحمل کننده شرایط اسیدی مقاومت متفاوتی نسبت به صفرا نشان دادند (جدول ۱). مقاوم ترین جدایه در این میان باکتری 1430BM با تنها ۱۲ دقیقه اختلاف رشد نسبت به نمونه شاهد بود.

جدول ۱- اثر اسید (pH ۲/۵) و نمک صفرا (۰/۳ درصد وزنی حجمی) بر رشد و زنده مانی جدایه ها

	اسید			صفرا
جدایه	لگاریم تعداد اولیه	لگاریم تعداد بعد از تیمار اسیدی	نرخ بقا (٪)	تأخیر رشد نسبت به شاهد (دقیقه)
630E	۵/۴۸±0/9	۴/۸۳±۱/۲	۸۸	>۶۰
2737C	۶/۶۲±۰/۳	۵/۵۰±۱/۳	۸۳	۵۰±۳/۰
230D	۶/۹۲±۰/۳	۵/۵۸±۰/۳	۸۰	۵۵±۲/۵
1337C	۶/۶۵±۰/۷	۴/۴۸±۰/۳	۷۱	۵۸±۱/۵
1430BM	۴/۷۸±۰/۴	۳/۳۰±۰/۹	۶۹	۱۲±۰/۵
7C37	۷/۲۵±۱/۱	۶/۳۸±۰/۹	۸۸	۴۰±۰/۵

جدایه 630E به دلیل اینکه بیش از ۶۰ دقیقه تأخیر رشد نشان داد به دلیل حساسیت به صفرا از ادامه مطالعات کنار گذاشته شد. از میان جدایه های به دست آمده، پنج جدایه قادر به تحمل صفرا و شرایط اسیدی برای آزمونهای بعد انتخاب شدند.

حساسیت به آنتی بیوتیک و فعالیت ضد میکروبی: آزمون حساسیت نسبت به ۷ آنتی بیوتیک با استفاده از روش دیسک انتشاری برای ۵ جدایه انجام شد. بر اساس نتایج (جدول ۲)، اکثر جدایه ها نسبت به آنتی بیوتیکهای به کار برده شده دارای حساسیت بوده اند. تنها جدایه 2737C به کلرآمفنیکل نیمه حساس بوده است. در سویه های گزارش شده در این پژوهش مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی مشاهده نگردید که پتانسیل پروبیوتیکی مطلوب آنها را نشان می دهد.

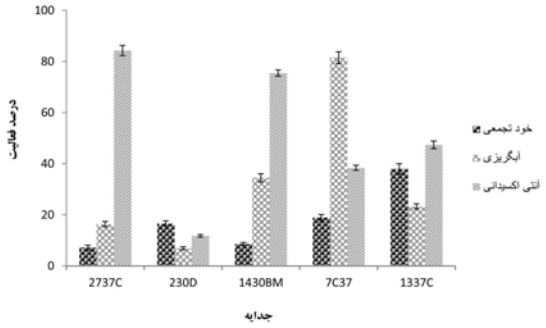
جدول ۲- حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک(میکروگرم بر دیسک). قطر هاله عدم رشد بر اساس میلی متر . S: حساس، I: نیمه حساس، R: مقاوم

نام جدایه	اریترومایسین (۱۵)	تتراسایکلین (۳۰)	ریفامپیسین (۵)	متی سیلین (۵)	کانامایسین (۳۰)	کلرامفنیکل (۳۰)	آمپی سیلین (۱۰)
2737C	S(۴۱±۲/۵)	S(۴۶±۲/۸)	S(۴۲±۱/۲)	S(۳۷±۳/۶)	S(۶۰±۳/۵)	I(۱۷±۱/۲)	S(۲۳±۱/۵)
230D	S(۳۷±۳/۴)	S(۵۰±۵/۲)	S(۲۶±۲/۴)	S(۵۷±۳/۵)	S(۳۶±۳/۱)	S(۴۵±۳/۹)	S(۳۹±۳/۹)
1337C	S(۲۰±۱/۵)	S(۲۱±۲/۰)	S(۴۰±۳/۵)	S(۲۲±۲/۳)	S(۳۵±۳/۵)	S(۳۷±۳/۳)	S(۲۷±۲/۵)
1430BM	S(۴۲±۳/۳)	S(۵۷±۴/۷)	S(۴۴±۳/۳)	S(۳۳±۳/۶)	S(۲۹±۱/۹)	S(۴۲±۳/۹)	S(۳۶±۳/۵)
7C37	S(۳۰±۲/۵)	S(۴۰±۳/۷)	S(۳۱±۲/۶)	S(۲۱±۲/۲)	S(۲۰±۱/۴)	S(۳۶±۴/۱)	S(۴۲±۲/۳)

جدول ۳ اثرات ضد میکروبی جدایه های به دست آمده در این پژوهش را نشان می دهد. به استثنای جدایه 1337C که قادر به مهار رشد هیچ یک از باکتریهای بیماری زای به کار برده شده در این پژوهش نبود، سایر جدایه ها حداقل قادر به مهار رشد ۲ باکتری بیماری زا بودند. بیشترین اثر ضد میکروبی در جدایه 1430BM با توان مهار رشد ۵ باکتری دیده شد. با این وجود هیچ کدام از جدایه های مورد ارزیابی قادر به مهار رشد باکتری *Pseudomonas aeruginosa* نبودند.

خودتجمعی، آب گریزی سطحی و آنتی اکسیدانی: نتایج قدرت خودتجمعی، آب گریزی سطحی و آنتی اکسیدانی

جدایه ها در شکل ۱ ارائه شده است. جدایه 7C37 با ۱۸/۹ و ۸۱/۵ درصد توان خود تجمعی و آب گریزی سطحی مطلوب ترین جدایه از نظر پتانسیل اتصال به سلولهای جدار روده است. جدایه 1430BM با وجود اینکه در سایر صفات بررسی شده توانمندی بالایی از خود بروز داده بود اما در ویژگی اتصال جزء جدایه های متوسط در نظر گرفته می شود. جدایه های مورد ارزیابی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی خوب (1430BM و 2737C) ، متوسط (7C37 و1337C) و ضعیف (230D) بوده اند.



شکل ۱- آزمونهای خود تجمعی، آب گریزی سطحی و آنتی اکسیدانی در جدایه های پروبیوتیک

جدول ۳- اثرات ضد میکروبی جدایه های پروبیوتیکی

نام جدایه	*E. coli*	*S. aureus*	*B. subtilis*	*B. cereus*	*P. aeruginosa*	*K. pneumoniae*
2737C	-	+	+	-	-	-
230D	+	-	+	-	-	-
1337C	-	-	-	-	-	-
1430BM	+	+	+	+	-	+
7C37	+	-	+	+	-	-

جهت انتخاب جدایه با پتانسیل پروبیوتیکی برتر از میان پنج جدایه مورد ارزیابی ، برای هر یک از هفت ویژگی پروبیوتیکی بررسی شده، جدایه ها به سه گروه خوب (گروه با بالاترین توانمندی در میان جدایه های مورد بررسی، ۳ امتیاز) ، متوسط (گروه با توانمندی متوسط در میان جدایه های مورد بررسی، ۲ امتیاز) و ضعیف (گروه با توانمندی پایین در میان جدایه های مورد بررسی، ۱ امتیاز) تقسیم بندی شدند (جدول ۴). بر اساس نتایج حاصل از مجموع صفات پروبیوتیکی جدایه 7C37 به عنوان جدایه با بالاترین توانمندی پروبیوتیکی انتخاب و توسط روش مولکولی شناسایی گردید. بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی ژن 16S rRNA، جدایه 7C37 متعلق به جنس *Enterococcus* با بیشترین شباهت به گونه *Enterococcus facium* (۹۹ درصد تشابه) بود. تمام داده ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. معنی دار بودن نتایج (با ۹۵ درصد اطمینان) با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شد.

جدول ۴- امتیاز دهی به سویه ها بر اساس نتایج آنالیز های مختلف. خوب ۳ امتیاز، متوسط ۲ امتیاز، ضعیف ۱ امتیاز (سویه برتر به صورت پر رنگ نشان داده شده است.)

نام جدایه	pH	صفرا	مقاومت به آنتی بیوتیک	ضد میکروبی	خود تجمعی	آبگریزی	آنتی اکسیدانی	مجموع امتیاز
2737C	۳	۱	۱	۲	۲	۱	۳	۱۳
230D	۳	۱	۳	۲	۲	۱	۱	۱۳
1337D	۲	۱	۳	۱	۳	۲	۲	۱۴
1430BM	۱	۳	۳	۳	۱	۲	۳	۱۶
7C37	۳	۲	۲	۳	۲	۳	۲	۱۷

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه جدایه های باکتری به دست آمده از پنیر سنتی قاینی به عنوان یک فراورده تخمیری لبنی در خراسان جنوبی جهت بررسی توانمندی پروبیوتیکی آنها مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به اینکه بیشتر مطالعات در جداسازی سویه های پروبیوتیک بر اعضای جنس لاکتوباسیلوس متمرکز شده است در این پژوهش به منظور امکان ارزیابی توانمندی پروبیوتیکی سایر سویه های موجود، شرایط معمول جداسازی لاکتوباسیلها مانند رشد در شرایط بی هوازی استفاده نگردید. از ویژگیهای لازم برای یک پروبیوتیک توانایی بقاء در شرایط دستگاه گوارش با مقاومت به اسید و صفراست. همچنین تحمل اسید امکان استفاده و بقای این سویه ها در محصولات غذایی اسیدی مانند ماست را بدون کاهش قابل توجه جمعیت باکتری فراهم می کند(۲۱). جدایه انتروکوکوس به دست آمده در این پژوهش مقاومت بالاتری نسبت به اسید و صفرا در مقایسه با برخی گونه های لاکتوباسیلوس (۱) داشته است. پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی، سویه های پروبیوتیک را نیز مصون نگذاشته است. میزان شیوع مقاومت به آنتی بیوتیکها در پروبیوتیکها با منطقه جداسازی آنها مرتبط می باشد. در پژوهشی روی سویه های پروبیوتیکی جدا شده از غذا های سنتی یک ناحیه روستایی، مقاومت به آنتی بیوتیکها مشاهده نگردید که دلیل آن به کارگیری درمانهای سنتی به جای آنتی بیوتیکها در منطقه مورد نظربیان شده است(۱۳). با این وجود در سایر پژوهشها مقاومت به آنتی بیوتیکهایی مانند استرپتومایسین در باکتریهای *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* گزارش شده است (۲۴). به هر روی عدم وجود مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه های پروبیوتیکی ضروری می باشد. در جدایه های به دست آمده در این پژوهش مقاومت بسیار اندکی نسبت به آنتی بیوتیکها (تنها یک جدایه نسبت به یک آنتی بیوتیک) مشاهده گردید. عدم شیوع ژنهای مقاومت در این جدایه ها ویژگی مطلوبی برای توانمندی پروبیوتیک آنهاست. از دیگر صفات لازم برای پروبیوتیکها توانایی مهار رشد باکتریهای بیماری زاست. پیدایش سریع سویه های بیماری زای مقاوم و سمیت مزمن مواد ضد میکروبی شیمیایی به دنبال استفاده گسترده از آنتی بیوتیکها، دانشمندان را ترغیب به پیدا کردن ابزارهایی ایمن در درمان عفونتهای باکتریایی کرده است. استفاده از باکتریهای پروبیوتیک برای حل این مشکل گزینه مناسبی است. یک پروبیوتیک مفید باید فعالیت ضد میکروبی بر علیه بیماری زاهای موجود در سیستم گوارش داشته باشد. جدایه های به دست آمده در این پژوهش تنها بر علیه باکتری *Pseudomonas* اثری نداشتند که با توجه به عدم حضور این باکتری در دستگاه گوارش محدودیت برای یک سویه پروبیوتیک نمی باشد.

جدایه های مورد بررسی در این پژوهش از نظر صفات لازم برای اتصال و کلونیزه شدن در دستگاه گوارش نیز دارای توانمندی قابل توجهی بودند. تجمع، یک فرآیند برگشت پذیر انباشت سلول است که باعث می شود سلولهای موجود در محیط به طور خود به خودی رسوب کنند. قدرت خود تجمعی و آب گریزی سطحی در باکتریهای پروبیوتیک برای اتصال به سلولهای جدار روده مهم و منجر به کلونیزاسیون باکتری و افزایش حضور در دستگاه گوارش می شود(۱۵). فعالیت آنتی اکسیدانی از دیگر صفات مشاهده شده در جدایه های به دست آمده از پنیر قاینی بوده است. رادیکالهای آزاد ، با دارا بودن الکترونهای جفت نشده مولکولهایی بسیار ناپایدار هستند که به دلایل مختلف در بدن ایجاد می گردند. این ترکیبات اکسید کننده به دنبال واکنش با سایر ماکرومولکولها موجب آسیب غشای سلول، آنزیمها و DNA می شوند. گاهی نتیجه این آسیب، ایجاد بیماریهای خطرناکی مانند سرطان و بیماریهای قلبی خواهد بود(۵). آنتی اکسیدانها ترکیبات شیمیایی هستند که از ایجاد آسیبهای اکسیداتیو جلوگیری کرده و یا آن را کاهش می دهد و برای حفظ سلامتی انسان

بسیار مهم می باشند. فعالیت آنتی اکسیدانی در برخی باکتریهای اسید لاکتیک گزارش شده و از صفات مطلوب در یک باکتری پروبیوتیک است (۲ و ۱۲).

بر اساس نتایج حاصل از مجموع صفات ارزیابی شده، باکتری 7C37 متعلق به جنس *Enterococcus* به عنوان کاراترین جدایه پیشنهاد گردید. جنس *Enterococcus* متعلق به گروه باکتریهای اسید لاکتیک است. اعضای این جنس در تخمیر مواد غذایی نقش مهمی دارند مانند نقش آنها در رسیدن پنیر و تولید ترکیبات معطر در آن و یا نقشی که آنها در برخی سوسیسها تخمیری دارند. به واسطه توانایی بالا در تحمل pH و نمک اعضای این جنس در طیف گسترده ای از غذاهای تخمیری یافت شده است. با وجود اینکه اعضای جنس انتروکوکوس به عنوان پروبیوتیکهای توانمند شناسایی شده اند امروزه برخی در مورد کار برد آنها رعایت احتیاط را ضروری می دانند. برخی از انواع این جنس در ایجاد عفونتهای بیمارستانی مانند اندوکاردیت، عفونت ادراری، و باکتریمی نقش دارند. ژنهای مقاومت به آنتی بیوتیکها، ژنهای اتصال و تهاجم و همولیزین از دلایل بیماری زا بودن این سویه هاست. با این وجود با گذشت بیش از بیست سال از مصرف انتروکوکها به عنوان پروبیوتیک تا کنون گزارشی از بیماری زا بودن این سویه ها منتشر نشده است. برخی محققین امکان انتقال افقی ژنهای بیماری زا به سویه های پروبیوتیک را مطرح می کنند. به هر حال این امکان در مورد سایر پروبیوتیک نیز قابل بیان است و همین طور دریافت یک ژن الزاماً به معنی تبدیل یک سویه به نوع بیماری زا نخواهد بود.

به عنوان نتیجه گیری کلی در این پژوهش جدایه *Enterococcus* sp.7C37با توانمندی پروبیوتیکی بالا از یک پنیر محلی در استان خراسان جدا گردید. این جدایه متعلق به گونه *Enterococcus facium* می باشد که در مقایسه با گونه *Enterococcus faecalis* ایمنی بیشتری دارد. مطالعات تکمیلی جهت بررسیها در کشت سلولی و مدل حیوانی جهت ارزیابی اثرات مطلوب این جدایه و همین طور توجه به نکات مورد نظر در استفاده با احتیاط *Enterococcus* ها برای به کارگیری آن ضروری است.

قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد (۳/۳۳۶۲۴) انجام شده است.

منابع

۱- ساجدی نژاد، ندا، شرفی، حکیمه، پاک نژاد، مژگان، سلیمانی، شایسته، یداالله، هوشمند، بهزاد، مدیری، سیما، شهبانی ظهیری، حسین، اکبری نوقابی، کامبیز. (1394). بررسی خاصیت ضد باکتریایی و پروبیوتیکی یک سویه لاکتوباسیلوس سالیواریوس ۰۲ NKجدا شده از دهان بر روی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*، باکتری شایع در بیماران با التهاب لثه. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی۸۴- ۷۶ : (۱) ۸.

۲- غلامپور فاروجی، نازنین، حداد مشهدریزه، علی اکبر، دولت آبادی، سمانه. (۱۳۹۵). بررسی زیست‌داده‌ای ویژگی‌های ساختاری، عملکردی و دامنه میزبانی آنزیم‌های باکتریایی موثر در مقاومت به استرس‌های اکسیداتیو. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۴۲۳-۴۰۹ : (۴) ۲۹.

3- Archer AC, Halami PM, 2015, Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. Applied and Microbiology and Biotechnology, 99, 19, 813-823.

4- Balouiri M, Sadiki M, Koraichi Ibnsouda S, 2016, Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6, 2, 71-79.

5- Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H, 1999, Oxidative injury and challenge of antioxidants to free radicals and reactive oxygen species. Critical Review in Oral Biology, 10, 4, 458-476.

6- CLSI, 2007, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne, PA: Clinical and laboratory standards institute.

7- De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo MR, Gobbetti M, 2001, Characterization of Non-Starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. Applied and Environmental Microbiology, 67, 5, 2011–2020.

8- Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H, 2017, *Bacillus* As Potential Probiotics: Status, Concerns, and Future Perspectives. Frontiers in Microbiology, 8, 1490, 1-15.

9- FAO/WHO, 2002, Guidelines for the evaluation of probiotic in food. http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotic2/en/ pp 1–11.

10- Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A, 2013, Sources, isolation, characterization and evaluation of probiotics. British Journal of Nutrition, 109, 2, 35-50.

11- Georgieva RN, Iliev IN, Chipeva VA, Dimitonova SP, Samelis J, Danova ST, 2008, Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. Journal of Basic Microbiology, 48, 4, 234–244.

12- Keunho Ji, Jang NY, Kim YT, 2015, Isolation of Lactic Acid Bacteria Showing Antioxidative and Probiotic Activities from Kimchi and Infant Feces. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25, 9, 1568-1577.

13- Khanghah SM, Ganbarov K, 2014, *Lactobacillus* with probiotic potential from homemade cheese in Azerbijan. Bioimpacts, 4, 1, 49–52.

14- Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR, 1985, Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses Proceedings of the National Academy of Sciences, 20, 6955–6959.

15- Potočnjak M, Pušić P, Frece J, Abram M, Janković T, Gobin I, 2017, Three New *Lactobacillus plantarum* Strains in the Probiotic Toolbox against Gut Pathogen *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. Food Technology and Biotechnology, 55, 1, 48–54.

16- Ramos CL, Thorsen L, Schwan RF, Jespersen L, 2013, Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. Food Microbiology, 36, 1, 22–29.

17- Rieder R, Wisniewski PJ, Alderman BL, Campbell SC, 2017, Microbes and mental health: A review. Brain Behavior Immunity, 66, 11, 9-17.

18- Santos KMO, Vieira ADS, Salles HO, Oliveira JdS, Rocha CRC, Borges MdF, et al, 2015, Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. Brazilian Journal of Microbiology 46, 1, 237-249.

19- Silva dias F, Ferreira Duarte W, Freitas Schwan R, 2013, Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Bioscience Journal, 29, 1, 1678- 1686.

20- Sornplang P, Piyadeatsoontorn S, 2016, Probiotic isolates from unconventional sources: a review. Journal of Animal Science and Technology, 58, 26, 1-11.

21- Vergin F, 1954, Anti- und Probiotika (Anti- and probiotics). Hippokrates, 25,4, 116 – 119.

22- Vinderola CG, Prosello W, Ghiberto D, Reinheimer JA, 2000, Viability of probiotic (*Bifidobacterium, Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. Journal of Dairy Science, 83, 9, 1905–1911.

23- Wang CY, Lin PR, Ng CC, Shyu YT, 2010, Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. Anaerobe Journal, 16, 6, 578- 585.

24- Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS, 2005, Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology, 98, 2, 211-217.

Isolation of *Enterococcus* sp. 7C37 with high probiotic potentials from Qaeni cheese, a diary fermented product in South Khorasan

Talebi S., Makhdoumi A. and Bahreini M.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran.

Abstract

Probiotics are live microorganisms with helpful effects on digestive system of human and animals. Isolation of novel bacteria with probiotic potentials from less investigated sources, expand the application of these microorganisms in human and animals health. Isolation and exploring the probiotic potentials of resident bacteria from a native cheese in south khorasan was the aim of the current study. In order to isolating the bacteria from Qaeni cheese, samples were inoculated on NA and MRS culture media after prepared suitable dilution. In order to assay their probiotic activity characteristics including acid and bile resistance, antibiotic susceptibility, antimicrobial activity, hydrophobicity, self-aggregation and anti-oxidant activity were analyzed among the selected strains. A total of 90 isolates were obtained in this study. Of them 30 isolates were selected as different ones base on colony pigmentation, microscopic morphology and Gram staining. A total of 5 isolated could survive in acidic and presence of bile conditions and selected for further analysis. All of the strains were susceptible to erythromycin, tetracycline, methicillin and chloramphenicol, rifampicin and ampicillin. Only one isolate was resistant to chloramphenicol. The most antibacterial activity was observed against *E. coli* and *B. subtilis*. Based on the results from all probiotic traits, strain 7C37 which belonged to the genus *Enterococcus* represent the highest probiotic potential. The novel strains from indigenous fermented cheese are good candidate for complementary analysis for selection as probiotic bacteria.

Key words: *Enterococcus*, Qaeni chesse, Fermented food, Probiotic