جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۳/ سال ۱۳۹۳

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک از شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی

طاهره نریمانی[۱] و علیرضا تاری‌نژاد[۲*]

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۲۶

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
[۲] دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
* مسئول مکاتبه: Email: atarinejad@yahoo.com

چکیده

هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از فلور موجود در شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی می‌باشد. برای رسیدن به این هدف، باکتری‌های اسید لاکتیک توسط روش‌های فنوتیپی (مورفولوژی سلولی، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست‌های بیوشیمیایی شامل رشد در دماها و غلظت‌های مختلف نمک و نیز تخمیر انواع قندها) جداسازی شدند و پتانسیل پروبیوتیکی آن‌ها (مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفراوی) مورد ارزیابی قرارگرفت. سپس برای شناسایی دقیق‌تر با جفت آغازگرهای اختصاصی، ژن 16S rRNA باکتری‌ها تکثیر و بعد از خالص-سازی محصول PCR، ژن مورد نظر برای توالی‌یابی ارسال شد. در پایان تحقیق، ۱۳ سویه لاکتوباسیلوس و ٦ سویه انتروکوکوس به عنوان فلور میکروبی طبیعی دارای پتانسیل پروبیوتیکی در شهرستان خوی گزارش شدند که کیفیت فراورده‌های لبنی این مناطق را تأمین می‌نمایند و این سویه‌ها پتانسیل کاربرد درفراورده‌های لبنی تولید شده در صنعت را دارا می‌باشند.

واژگان کلیدی: انتروکوکوس، باکتری‌های پروبیوتیک، ژن 16S rRNA، لاکتوباسیلوس

مقدمه

از گذشته‌های بسیار دور، مردم دنیا می‌دانستند که مصرف شیر و محصولات لبنی تأثیر زیادی بر سلامتی آن‌ها دارد و حتی در طب سنتی از برخی از فراورده های تخمیری شیر استفاده می‌نمودند. اما در آن زمان وجود میکروارگانیسم‌ها در فراورده‌های لبنی اثبات نشده بود تا زمانی‌که دانشمند روسی مکنیکف، برای اولین‌بار نشان داد که باکتری موجود در لبنیات بلغاری ها، علت افزایش طول عمر مردم این ناحیه بوده است که به عنوان لاکتوباسیلوس بولگاریکوس شناخته شد (مکنیکف ۱۹۰۷). باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان مکمل‌های غذایی زنده میکروبی و با اصلاح تعادل میکروبی روده، میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. پروبیوتیک‌ها به‌طور فزاینده-ای به عنوان مکمل‌های رژیمی به صورت قرص، کپسول،

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خمیر و تیمارهای منجمد خشک شده به بازار عرضه می‌شوند (سالمینن و همکاران ۱۹۹۸). اخیراً آزمون‌های بالینی اثرات مفید باکتری‌های پروبیوتیک از قبیل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تحریک سیستم ایمنی، تعدیل هموستازی ایمنی سیستمیک، خصوصیات ضد توموری و اصلاح عدم تحمل لاکتوز را نشان داده‌اند. همچنین محققان به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های پروبیوتیک با تولید باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی، رشد پاتوژن‌ها را مهار می‌کنند (سالمینن و همکاران ۱۹۹۸).

از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده‌اند که در این میان دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزو فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیر شده بوده و کاندیدای خوبی برای پروبیوتیک محسوب می شوند (کلین هامر و همکاران ۲۰۰۰).

لاکتوباسیلوس‌ها میله‌ای شکل و گرم مثبت بوده و در صنعت غذا از جمله در سرکه‌سازی، تولید پنیر و ماست نقش به‌سزایی ایفا می‌کنند (براین و همکاران ۱۹۹۹). جنس انتروکوکسی یکی دیگر از جنس‌های اصلی باکتری‌های اسیدلاکتیک را تشکیل می‌دهد و توزیع وسیع آن‌ها در طبیعت احتمالاً بوسیله ماندگاری و مقاومت به فاکتورهای بازدارنده رشد توضیح داده می شود (هولزاپفل و همکاران ۲۰۰۲).

تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی از جمله خصوصیات اولیه و ضروری تحقیق برای غربالگری سویه‌های با پتانسیل پروبیوتیکی در نظر گرفته شده است (دورمه و همکاران ۲۰۰۱).

علاوه‌بر شناسایی بیوشیمیایی، استفاده از ژن 16S rRNA در شناسایی مولکولی توسط واکنش PCR انجام شده است (بولوت ۲۰۰۳؛ ساکیر ۲۰۰۳). ژن 16S rRNA دارای طول تقریباً ۱۵٤۰ باز است و مناطق متغیری دارد، ساختار کلی حفاظت شده است. از ویژگی سراسری گرفته تا ویژگی گونه استفاده از ژن16S rRNA برای مطالعه روابط فیلوژنتیکی بین میکروارگانیسم‌ها و شناسایی صحیح‌تر آن‌ها ممکن است (هولزاپفل و همکاران ۱۹۹۸؛ چارتریس و همکاران ۱۹۹۷). با توجه به روند رو به رشد مصرف فراورده های لبنی پروبیوتیک در جهان و کشورمان و افزایش استفاده از فراورده‌های لبنی به عنوان ابزاری برای انتقال میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک به دستگاه گوارش، بررسی پتانسیل پروبیوتیکی فراورده‌های لبنی سنتی شیر و ماست محلی گاومیش شهرستان خوی به عنوان یک نمونه مورد مطالعه و جداسازی وشناسایی سویه‌های بومی به منظور امکان استفاده از آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی منطقه به عنوان فراورده‌های پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های شیر و ماست سنتی گاومیش از شهرستان خوی جمع‌آوری و در فالکون‌های استریل و در درون بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت اولیه

تهیه سوسپانسیون باکتریایی از نمونه‌های شیر وماست با استفاده از محلول پپتون فیزیولوژیکی (PPS) استریل (۸/۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم و ۱ گرم بر لیتر پپتون باکتریولوژیکی) انجام شد. ابتدا حدود ۱۰ گرم از نمونه های ماست با استفاده از یک قاشقک استریل و ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های شیر برداشته شد و هر کدام به صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر PPS استریل انتقال گردید و به آرامی تکان داده شد تا میکروارگانیسم‌ها جدا شوند. بعد از نیم ساعت ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده به صورت جداگانه، به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS مایع انتقال یافت و در شرایط کم هوازی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پائین) و دردمای ۳۷ °C به مدت ۲٤ ساعت انکوبه گردید تا باکتری‌ها به حداکثر

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدار خود برسند. تمامی این مراحل در زیر هود لامینار و شرایط استریل انجام شد (کالیچیا و همکاران ۱۹۹۳).

غربال جمعیت باکتریایی اولیه و انتخاب سویه‌های مقاوم به اسید

در این مرحله بعد از کشت ۲٤ ساعته، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی نمونه‌های شیر و ماست به بافر PBS با pH= ۳ تلقیح شدند. سپس نمونه‌های تلقیح شده در بافر PBS به مدت ۲/۵ ساعت در ۳۷ ^{o}C انکوبه شدند، سپس جهت جداسازی باکتری‌های مقاوم به اسید، باکتری‌های زنده مانده (باکتری‌های مقاوم به اسید) در شرایط اسیدی با استفاده از سانتریفیوژ ترسیب و به محیط کشت MRS مایع، به منظور غنی سازی انتقال یافتند. نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعت و در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شدند. بعد از ۲٤ ساعت، سلول‌ها با استفاده از سرم فیزیولوژیکی استریل (کلرید سدیم: ۸/۵ گرم بر لیتر) تا ده برابر رقیق شدند و از هر رقت ۱ میلی‌لیتر و به صورت پورپلیت در محیط کشت MRS آگار کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هوازی و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۷۲-٤۸ ساعت انکوبه گردیدند. از پلیت‌های دارای کلنی‌های قابل شمارش، حدود ۱۰ درصد از کلنی‌ها با مورفولوژی متفاوت جداسازی و روی محیط کشت MRS آگار خالص‌سازی شدند، سپس همه سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ، رنگآمیزی گرم و واکنش کاتالاز بررسی شدند. باکتری های گرم مثبت و کاتالاز منفی در محیط کشت MRS مایع با ۲۵٪ گلیسرول استریل و ۲۵٪ شیر پس چرخ در دمای ^{o}C ۸۰- نگهداری شدند (ارکیلا و پتاچا ۲۰۰۰).

آزمایش‌های میکروبی

تعیین درصد بقای سویه‌ها در شرایط اسیدی معادل با شرایط اسیدی معده

سویه‌های جدا شده، در محیط MRS مایع و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۲٤ ساعت رشد داده شدند. یک میلی‌لیتر از هر کشت باکتریایی در ۹ میلی‌لیتر PBS با pH برابر با ۲/۵ تلقیح شدند و نمونه‌ها به‌مدت ۳ ساعت در ۳۷ ^{o}C انکوبه گردیدند. برای تعیین درصد بقا، CFU در لحظه تلقیح و در انتهای انکوباسیون ۳ ساعته در محیط معدنی PBS، برای هر سویه به صورت جداگانه تعیین گردید. برای تعیین CFU به ازای هر میلی‌لیتر، در زمان صفر (لحظهٔ تلقیح) و در انتهای ساعت ۳، از کشت‌های باکتریایی اولیه و تلقیح شده در محیط PBS به صورت سریالی تا ۱۰ برابر رقت‌سازی با سرم فیزیولوژی و برای هر رقت دو کشت به صورت پورپلیت انجام گردید و پلیت‌ها به صورت کم هوازی و در دمای ۳۷ ^{o}C به مدت ۳-۲ روز انکوبه شدند. در پایان مدت انکوباسیون، پلیت‌ها از انکوباتور برداشته شدند و برای حضور کلنی‌های قابل مشاهده بررسی شدند. پلیت‌های دارای تعداد قابل شمارش از کلنی‌ها و به‌طور معمول پلیت‌های دارای ۳۰ الی ۳۰۰ کلنی، برای شمارش انتخاب شدند و تعداد کلنی-های هر پلیت یادداشت گردید. تعداد کلنی‌های تقریباً یکسان در پلیت‌های تکراری در هر سطح رقت و همچنین اختلاف تقریباً ۱۰ برابری کلنی‌ها در رقت‌های متوالی صحت شمارش را نشان داد و در نهایت CFU برای هر کشت باکتریایی محاسبه گردید.

تعیین مقاومت سویه‌ها به نمک‌های صفراوی

محیط کشت MRS مایع به عنوان کنترل وMRS مایع دارای ۰/۳ درصد املاح صفراوی به عنوان کشت مورد آزمایش (تیمار) به‌طور همزمان با یک درصد از کشت باکتریایی فعال ۲٤ ساعته تلقیح و در دمای ۳۷ ^{o}C انکوبه شدند. رشد در کشت‌های کنترل و تیمار، هر نیم ساعت یکبار با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ٦۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری GENESYS^{TM}5 کنترل شد. برای محدود کردن جذب نوری به رشد باکتریایی، جذب نوری محیط‌های کنترل و تیمار در طول موج ٦۰۰ نانومتر با استفاده از MRS مایع و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد بایل بدون تلقیح باکتریایی، صفر شد. رشد به مدت ۷ ساعت دنبال شد و منحنی جذب براساس زمان انکوباسیون رسم گردید. منحنی‌های رشد برای هر سویه رسم و براساس اختلاف

زمانی در جذب‌های نوری متوالی بین کشت‌های کنترل و تیمار تحلیل شد. این اختلاف برحسب دقیقه بیان و به‌عنوان تأخیر در رشد در نتیجهٔ اثر بازدارندگی بایل (نمک‌های صفراوی) در نظر گرفته شد (گیل‌لیلند و همکاران ۱۹۸٤).

آزمایش‌های بیوشیمیایی

براساس روش‌های توصیه شده برگی در کتاب گریتی و همکاران (۲۰۰٤) و هولزاپفل و وود (۱۹۹۵) شناسایی مورفولوژیکی سویه‌ها با استفاده از تست کاتالاز، رنگ آمیزی گرم، رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ٤٥ ^{o}C و رشد در غلظت‌های مختلف نمک (٦/٥ و ٤ درصد حجمی- وزنی کلریدسدیم در محیط کشت MRS مایع) انجام شد.

تعیین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها

الگوهای تخمیر کربوهیدرات‌ها (۱۷ قند شامل آرابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکارز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز، ملوزیتوز)، برای همه سویه‌ها در محیط کشت MRS مایع دارای معرف فنل قرمز (۰/٥ گرم بر لیتر) تعیین گردید. محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوگز و عصارهٔ گوشت و با افزودن فنل قرمز تهیه گردید. همهٔ قندها به صورت محلول استوک ٥٪ تهیه و به وسیلهٔ یک فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر استریل گردید. سپس ۰/٥ میلی لیتر از محلول قندهای استریل به ٤/٥ میلی‌لیتر محیط کشت پایه افزوده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند و ٥۰ میکرولیتر از کشت فعال به محیط دارای قندهای اختصاصی تلقیح و به منظور مشاهدهٔ واکنش‌های تأخیری به مدت ٥ الی ۷ روز در دمای ایزولاسیون (۳۷ ^{o}C) انکوبه گردیدند. در پایان مدت انکوباسیون، نتایج براساس تغییر رنگ معرف فنل از قرمز به زرد ارزیابی و درحالت مثبت و منفی ثبت گردید (هاریگان و مک کانس ۱۹۷٦).

آزمایش‌های مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB و لیزبافر انجام شد. ترکیبات لیزبافر شامل تریس ۱ مولار با ۷/٥ =pH، کلرید سدیم ٥ مولار، EDTA ۰/٥ مولار و SDS ۲ درصد و آب مقطر می‌باشد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد در الکتروفورز به کار گرفته شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر قطعه ژن 16S rRNA

پرایمرهای اختصاصی برای تکثیر قطعه16S rRNA برای سویه‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 و با کمک توالی‌های 16S rRNA موجود در سایت بانک ژنی NCBI طراحی گردید و واکنش PCR با پرایمرهای LF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و LR (5'AAGGTTACCTCACCGACTTC3') اختصاصی سویه‌های لاکتوباسیلوس انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹٥ ^{o}C به مدت ٤ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹٤ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ٥۷ ^{o}C به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ ^{o}C به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ ^{o}C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با (۱۲/٥ µl) Master mix ساخت شرکت سیناژن، پرایمر مستقیم و معکوس هر کدام (۰/٤ µM) و (٥۰ ng/ µl) DNA و رساندن حجم نهایی واکنش با آب مقطر استریل به حجم به µl ۲٥ انجام شد.

تفکیک قطعات تکثیر یافته

برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/٥ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌های تکثیریافته به نسبت ٦ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز، ژل مورد نظر توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و نوارهای تکثیریافتهٔ DNA در همهٔ نمونه‌ها به صورت تک نوار و

با اندازهٔ تقریبی ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید و با غلظت‌های مناسب با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام گرفت.

خالص‌سازی محصول PCR

با توجه به دستورالعمل کیت خالص‌سازی از ژل آگارز، محصول PCR تخلیص گردید.

ارسال جهت توالی‌یابی

سویه‌ها در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر به همراه دو پرایمر مستقیم و معکوس (با غلظت‌های ۵۰ پیکومول بر میکرولیتر) در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

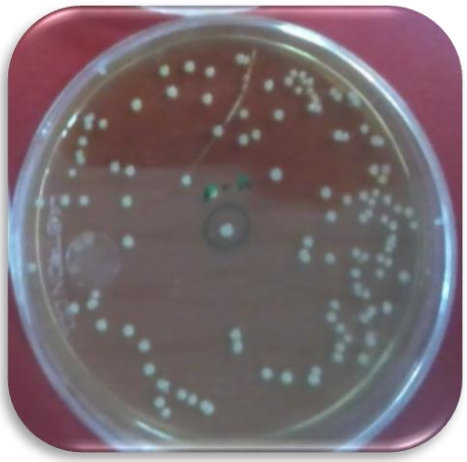
نرم‌افزار آماری و بیوانفورماتیکی

نتایج بدست آمده با استفاده ازنرم‌افزار آماری SPSS13 برای لاکتوباسیلوس‌ها و انتروکوکوس‌ها مورد تجزیه قرار گرفته و گروه‌بندی به عمل آمد. Alignمربوط به توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه‌ها با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST در NCBI انجام شد.

نتایج و بحث

از دو محصول شیر و ماست سنتی گاومیش شهرستان خوی، در کل ۱۹ سویه باکتری با پتانسیل پروبیوتیک جداسازی گردید که شامل ۱۳ سویه لاکتوباسیلوس و ٦ سویه انتروکوکوس می‌باشد (شکل ۱). تفکیک سویه‌ها ونامگذاری آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

براساس درصد بقا، سویه‌ها به ٤ گروه حساس، مقاومت متوسط، مقاومت خوب و مقاومت بسیار خوب تقسیم شدند. براساس این نتایج، سویه E1 کمترین مقاومت و ٥ سویه باسیلی شکل و ٤ سویه کوکسی شکل مقاومت متوسط و ٦ سویه باسیلی شکل و ۱ سویه کوکسی شکل مقاومت خوب و دو سویه L3 و L13 مقاومت بسیار خوبی را دارا بودند. شکل ۲ مربوط به شمارش تعداد کلنی سویه‌های باکتریایی، در لحظه تلقیح و بعد از انکوباسیون سه ساعته در شرایط اسیدی معادل با اسید معده در ادامه آورده شده است.



شکل۱- کلنی‌های ظاهر شده در محیط کشت MRS آگار

جدول ۱- سویه‌های جداسازی شده از فراورده‌های لبنی سنتی

نمونه لبنی	سویه‌های لاکتوباسیلوس	سویه‌های انتروکوکوس
شیر گاومیش خوی	L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7	-
ماست گاومیش خوی	L8, L9, L10, L11, L12, L13	E1, E2, E3, E4, E5, E6
کل نمونه‌ها	۱۳	٦

*E نشان‌دهنده سویه‌های انتروکوکوس و L نشان‌دهنده سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد.

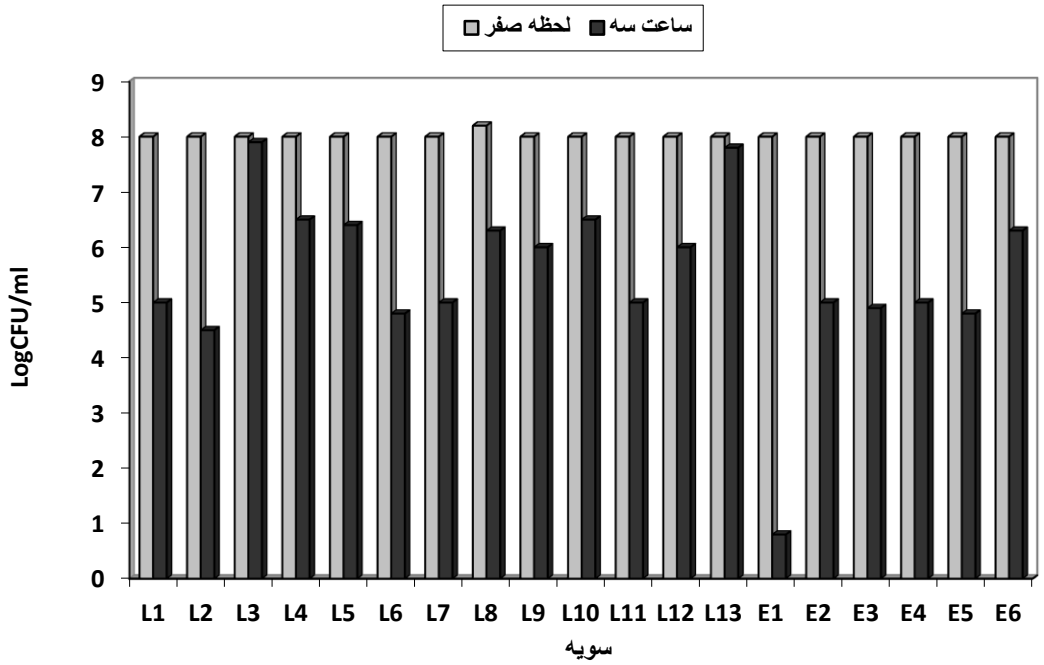
تعیین تحمل به اسیدیته برای تمام ۱۹ سویه، در بافر PBS با pH برابر با ۲/۵ به طول سه ساعت در ۳۷ ^{o}C انجام شد که نتایج در جدول ۲ گزارش شده است.

تحقیقات مشابه انجام شده توسط کانوی و همکاران (۱۹۸۷) و فرناندز و همکاران (۲۰۰۳) برای انتخاب سویه-های لاکتوباسیلوس مقاوم به اسید با استفاده از محتوی معده گزارش شده است. بررسی‌ها نشان دادند که بقای لاکتوباسیلوس‌ها در بافر PBS نسبت به محتوی معده، به خاطر اثر حفاظتی ترکیبات موجود در محتوی معده بر

روی سلول‌های باکتریایی، اندکی پایین‌تر است. آن‌ها بافر PBS با pH مناسب را برای غربال سویه‌های باکتریایی، به منظور حفظ بقا در شرایط "*in vivo*" پیشنهاد کردند (کانوی و همکاران ۱۹۸۷). با توجه به اینکه تحمل محیط اسیدی معده، تنها یکی از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می باشد و برای جلوگیری از دست رفتن سویه‌هایی با سایر خصوصیات پروبیوتیکی مثل مقاومت بالا در برابر نمک‌های صفراوی، توانایی کلونیزاسیون به سلول‌های اپیتلیالی روده‌ای و سایر خصوصیات بیولوژیکی مفید می‌توان انجام آزمایش‌ها را بدون در نظرگرفتن pH آغاز نمود. زیرا می‌توان میکروارگانیسم های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارشی رساند. در این زمینه مطالعه‌ای که توسط کیم و همکاران وی (۲۰۰۶) انجام شد، مشخص گردید که میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم به‌طور مؤثر میکروارگانیسم را از تیمار اسیدی و دمایی در موقع انتقال به روده، بدون تأثیر منفی بر روی عملکرد پروبیوتیکی، حفاظت می‌کند.

جدول ۲- تعیین درصد بقای سویه‌ها در pH=۲/۵ به مدت ۳ ساعت

درصد بقا	کمتر از ۱۰٪	بین ۶۰٪ و ۱۰٪	بین ۸۰ ٪ و ۶۰٪	بیشتر از ۸۰ ٪
شیر گاومیش خوی	-	L1, L2, L6, L7	L4, L5	L3
ماست گاومیش خوی	E1	L11, E2, E3, E4, E5	L8, L9, L10, L12, E6	L13



شکل۲- تأثیر محیط اسیدی PBS با pH=۲/۵ در لحظه صفر و بعد از انکوباسیون سه ساعته بر روی بقای سویه‌های جداسازی شده

بعد از تعیین مقاومت به اسید، مقاومت سویه‌ها به نمک های صفراوی مورد بررسی قرار گرفت. کیسه صفرا یک نقش اساسی در مکانیسم دفاعی اختصاصی و غیر اختصاصی روده بازی می‌کند و شدت اثر بازدارندگی آن به‌وسیله غلظت نمک‌های صفراوی تعیین می‌شود. در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد وزنی/ حجمی است و برای غربال سویه‌های مقاوم به صفرا، بحرانی و کافی تلقی می‌شود (پناچیا و همکاران ۲۰۰٤).

ایجاد تأخیر در رشد سویه‌ها با نمک‌های صفراوی، در نتایج براساس پیشنهاد ارایه شده توسط چاتئو و همکاران (۱۹۹٤) که چهار گروه متمایز را براساس تأخیر رشد ایجاد شده به‌وسیلهٔ نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند، تحلیل گردیدند:

۱-سویه‌های مقاوم (دارای تأخیر رشدی مساوی یا کمتر از ۱۵ دقیقه)

۲-سویه‌هایی با تحمل بالا (تأخیر رشدی بین ۱۵ و ٤۵ دقیقه)

۳-سویه‌هایی با تحمل ضعیف (دارای تأخیر رشدی بین ٤۰ و ٦۰ دقیقه)

٤-سویه‌های حساس (تأخیر رشدی بیشتر از ٦۰ دقیقه)

۱۹ سویه منتخب، براساس تأخیر رشد گروه‌بندی شدند که نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

جدول۳- تعیین مقاومت به نمک‌های صفراوی

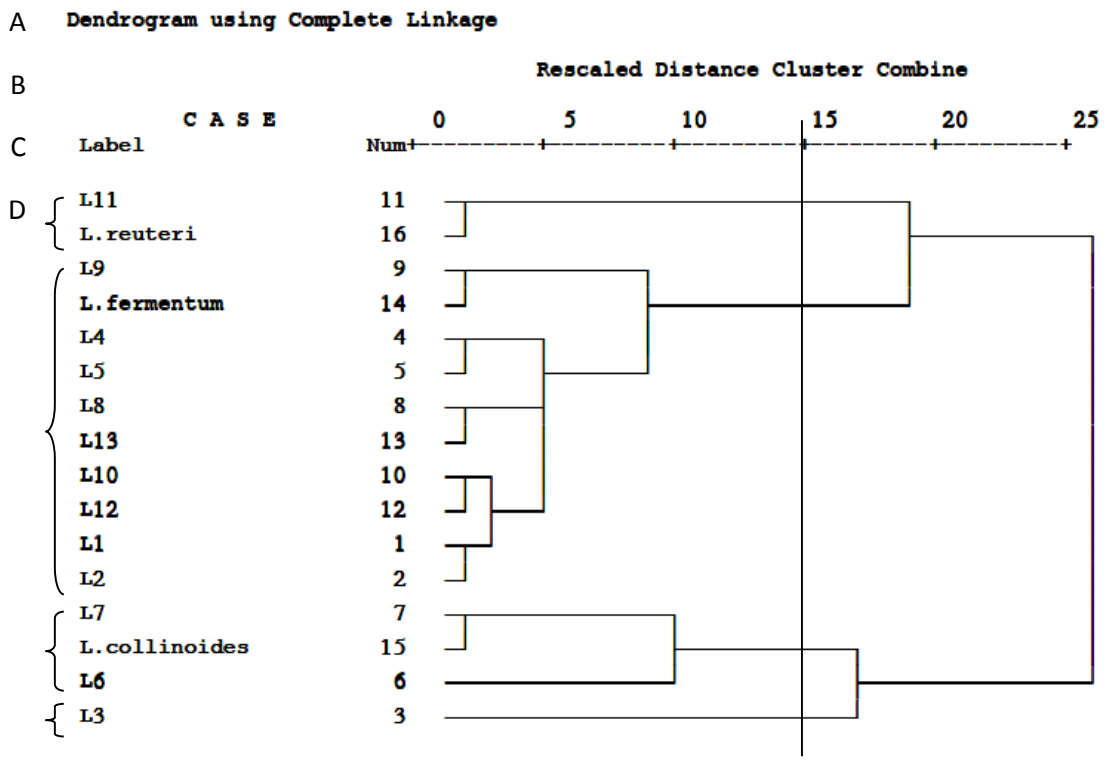
تأخیر رشد برحسب دقیقه	d≤15	15≤d≤40	40≤d≤60	d≥60
سویه‌ها	مقاوم	تحمل بالا	ضعیف	حساس
L8	+			
L3, L4, L5, L9, L10, L12, L13 E2, E4, E6		+		
L1, L2, L6, L7, L11, E1, E3, E5			+	
-				+

* علامت + نشان دهنده اعضای گروه است.

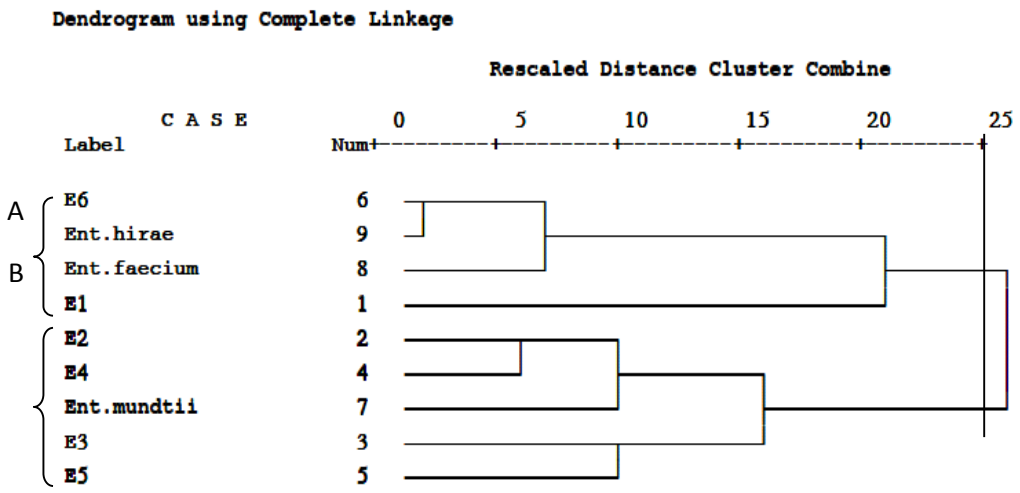
در مطالعه‌ای که توسط چاتئو و همکاران (۱۹۹٤) انجام شد، تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی رشد ۳۸ سویه لاکتوباسیلوس استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مورد آزمایش قرار گرفت. نیمی ازسویه‌های مورد آزمایش به آرامی تحت‌تأثیر نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد قرار گرفتند و تأخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به یک جذب نوری ۰/۳ در طول موج ٦۰۰ نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک های صفراوی به نمایش گذاشتند. یافته‌ها در آزمایش سویه‌های انتخاب شده نسبت به نمک‌های صفراوی با یافته‌های موجود در مطالعات قبلی مطابقت داشت. در مورد همه سویه‌های آزمایش شده، تأخیر در رشد سویه‌های تیمار داده شده با نمک‌های صفراوی نسبت به کشت کنترل (بدون تیمار) مشهود بود.

بعد از انتخاب باکتری‌های مقاوم به اسید و تعیین میزان تحمل آن‌ها به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی، شناسایی مقدماتی آن‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. با توجه به مشخصات فنوتیپی، بیوشیمیایی و الگوی تخمیر قندی سویه‌های لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس و رسم دندروگرام مربوطه، لاکتوباسیلوس‌ها با ضریب تشابه ۱۵ درصد در چهار گروه و انتروکوکوس‌ها با ضریب تشابه ۲۵ درصد در دو گروه، قرار می‌گیرند. شکل ۳ دندروگرام حاصل را برای سویه‌های لاکتوباسیلوس و شکل ٤ دندروگرام

سویه‌های انتروکوکوس را براساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد.



شکل۳- دندروگرام مربوط به سویه‌های لاکتوباسیلوس



شکل۴- دندروگرام مربوط به سویه‌های انتروکوکوس

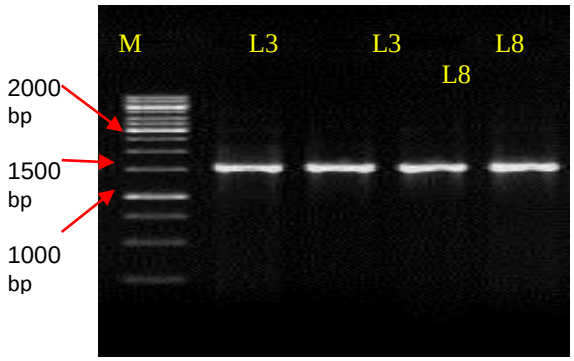
با رسم دندروگرام، سویه‌های لاکتوباسیلوس به چهار گروه A, B, C, D تقسیم‌بندی شدند. در گروه A سویه L11 الگوی تخمیر قندی مشابهی با لاکتوباسیلوس رئوتری نشان داد. گروه B شامل ۹ سویه می‌باشد که

سویه L9 مشابه با لاکتوباسیلوس فرمنتوم و مجموعه سویه‌های L4, L5, L8, L13, L10, L12, L1, L2 با ضریب تشابه ۱۰ درصد از لاکتوباسیلوس فرمنتوم جدا شدند. گروه C شامل دو سویه می‌باشد. سویه L7 کاملاً مشابه با لاکتوباسیلوس کولینویدیس و سویه L6 با ضریب تشابه ۱۰ درصد از لاکتوباسیلوس کولینویدیس مجزا شده است. سویه L3 به تنهایی در گروه D قرار گرفته است و برای شناسایی دقیق‌تر به مرحله مولکولی و توالی‌یابی ارسال شد. با رسم دندروگرام، سویه‌های انتروکوکوس با ضریب تشابه ۲۵ درصد به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. گروه A الگوی رشدی و الگوی تخمیر کربوهیدراتی نزدیکی با انتروکوکوس هیرا و انتروکوکوس فاسیوم نشان دادند. سویه E6 الگوی کاملاً مشابهی با انتروکوکوس هیرا نشان داد و با ضریب تشابه ۷ درصد مشابه با انتروکوکوس فاسیوم می‌باشد. همچنین سویه E1 با ضریب تشابه ۲۱ درصد از این گروه جدا شده است. گروه B شامل چهار سویه E2, E4, E3, E5 می‌باشد که الگوی تخمیر کربوهیدراتی نزدیکی با انتروکوکوس موندتی نشان دادند.

رسولی و همکاران (۱۳۸۸) از پنیر سنتی لیقوان در شمال‌غرب ایران، با استفاده از روش‌های شناسایی بیوشیمیایی، ۲۰ سویه جداسازی کردند که ۱۹ سویه کاتالاز منفی و تنها یک سویه کاتالاز مثبت بود. سویه های غالب شامل انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌باشند.

در تحقیقات مشابه حسنی و همکاران (۱۳۹۰) باکتری های لاکتوباسیلوس را از پنیر سنتی لیقوان جداسازی و شناسایی نمودند که در میان سویه‌های جدا شده، گونه های غالب متعلق به گونه پلانتاروم و گونه کازئی بودند. شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر بر اساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی عدم تکرارپذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز می‌باشد. زیرا علاوه‌بر متفاوت بودن شرایط کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد. بنابراین شناسایی دقیق‌تر در این تحقیق توسط روش های مولکولی و توالی‌یابی انجام گرفته است (آیله و همکاران ۲۰۰۱). در مطالعه‌ای از پنیر سنتی که در منطقه-ای از ایتالیا ساخته می‌شود، برای انتخاب باکتری های استارتر اسید لاکتیک استفاده کردند. با روش‌های شناسایی بیوشیمیایی ۱۱۲ باکتری گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی گردید. شناسایی مولکولی سویه‌ها توسط تکثیر ۳۸۰-۳۶۰ جفت باز از ژن 16S rRNA صورت گرفت (آکولانتی و همکاران ۲۰۰۷).

براساس نتایج حاصل از کلاستربندی تست‌های بیوشیمیایی، دو سویه لاکتوباسیلوس L3 و L8 برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. شکل ۵ نتایج حاصل از نواربندی تکثیریافته را در ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید برای دو سویه L3 و L8 در دو تکرار نشان می‌دهد.



شکل۵- الکتروفورز محصولات تکثیری توالی‌های ژن 16S rRNA برای سویه‌های جدا شده لاکتوباسیلوس

مقایسه‌ها نشان می‌دهد که نتایج توالی‌یابی برای سویه L3 حاکی از تشابه ۱۰۰ درصد ۱۴۵۸ نوکلئوتید با توالی 16S rRNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی برای لاکتوباسیلوس برویس زیرگونه ۸۷۷G بود که سویه L3 در بانک ژنی به ثبت خواهد رسید. نتایج Align در شکل ۶ آورده شده است.

***Lactobacillus brevis* strain 877G 16S ribosomal RNA gene, |JX545342.1|**
Score=2693bits(1458),Identities=1458/1458(100%)Gaps=0/1458(0%), Strand= Plus/Plus

```
Query  6    TGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCACT  65
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  18   TGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAGCTTCCGTTGAATGACGTGCTTGCACT  77

Query  66   GATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCCAGAA 125
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  78   GATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGGAATCTGCCCAGAA 137

Query  126  GCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGAT 185
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  138  GCAGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGAT 197

Query  186  TTTGTTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGT 245
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  198  TTTGTTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGT 257

Query  246  TGGTGAGGTAAAGGCCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC 305
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  258  TGGTGAGGTAAAGGCCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCC 317

Query  306  ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC 365
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  318  ACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC 377

Query  366  AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA 425
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  378  AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA 437

Query  426  ACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAA 485
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  438  ACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGACGGTATTTAA 497

Query  486  CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 545
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  498  CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT 557

Query  546  GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC 605
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  558  GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC 617

Query  606  TTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT 665
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  618  TTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGT 677

Query  666  GGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC 725
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  678  GGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGC 737

Query  726  GGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA 785
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  738  GGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA 797

Query  786  TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC 845
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  798  TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC 857

Query  846  AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT 905
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  858  AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT 917

Query  906  CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG 965
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  918  CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG 977

Query 966   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTC1025
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 978   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTC1037

Query 1026  GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT1085
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1038  GGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT1097
```

```
Query 1086 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTGG1145
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1098 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTGG1157

Query 1146 TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT1205
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1158 TGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT1217

Query 1206 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGGC1265
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1218 ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGGC1277

Query 1266 TAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA1325
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1278 TAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA1337

Query 1326 AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG1385
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1338 AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG1397

Query 1386 TACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTC1445
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1398 TACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTC1457

Query 1446 GGGAGTCAGCCGTCTAAG 1463
           ||||||||||||||||||
Sbjct 1458 GGGAGTCAGCCGTCTAAG 1475
```

شکل ۶- Align دو رشته Plus مربوط به توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه L3 با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST در NCBI

بلاست توالی 16S rRNA سویه L8 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی نشان داد که این سویه متعلق به لاکتوباسیلوس پلانتاروم زیرگونه short با تشابه ۹۹ درصد می‌باشد که توالی این ژن در بانک ژنی به ثبت خواهد رسید. نتایج Align در شکل ۷ آورده شده است.

***Lactobacillus plantarum* strain short 16S ribosomal RNA gene, |HQ259243.1|**
Score= 2678 bits(1450), Identities= 1455/1457(99%)Gaps= 1/1457(0%), Strand= Plus/Plus

```
Query  12   GTGCTATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTAC  71
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  15   GTGCTATA-ATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTAC  73

Query  72   ATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGAT 131
            |||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  74   ATTTGAGTGAGAGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGAT 133

Query  132  AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGA 191
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  134  AACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGA 193

Query  192  AAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGT 251
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  194  AAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGT 253

Query  252  AACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGA 311
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  254  AACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGA 313

Query  312  CTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGA 371
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  314  CTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGA 373

Query  372  AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTG 431
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  374  AAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTG 433

Query  432  TTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGC 491
```

```
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  434 TTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGC 493

Query  492 CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT 551
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  494 CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATT 553

Query  552 TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCA 611
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  554 TATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCA 613

Query  612 ACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCA 671
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  614 ACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCA 673

Query  672 TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG 731
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  674 TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG 733

Query  732 GTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT 791
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  734 GTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT 793

Query  792 AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA 851
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  794 AGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCA 853

Query  852 GCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT 911
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  854 GCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT 913

Query  912 TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC 971
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  914 TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACC 973

Query 972  TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATG1031
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 974  TTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATG1033

Query 1032 GATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC1091
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1034 GATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC1093

Query 1092 AACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGC1151
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1094 AACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGC1153

Query 1152 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG1211
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1154 CGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG1213

Query 1212 GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAAT1271
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1214 GCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAAT1273

Query 1272 CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT1331
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1274 CTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAAT1333

Query 1332 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG1391
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1334 CGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG1393

Query 1392 CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCA1451
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1394 CCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCA1453

Query 1452 GCCGCTAAGTGAACAAG 1468
            |||||||||||||||||
Sbjct 1454 GCCGCTAAGTGAACAAG 1470
```

شکل ۷- Align دو رشته Plus مربوط به توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه L8 با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST در NCBI

نتیجه‌گیری

این تحقیق نشان داد که شیر سنتی و ماست تولید شده به روش سنتی منبع مهمی برای باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. بنابراین جداسازی و استفاده از این باکتری‌ها به عنوان استارتر به پنیر و ماست‌های صنعتی این امکان را فراهم خواهد کرد که محصولات لبنی با ویژگی‌های مطلوبی از نظر کیفیت به بازار عرضه شده و مصرف-کنندگان راه جدیدی برای بهره‌مندی از سلامتی خود خواهند یافت، زیرا مصرف این باکتری‌ها می‌تواند سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی را تقویت کند.

منابع مورد استفاده

حسنی م، حصاری ج، فرج‌نیا ص، مقدم واحد م،۱۳۹۰، بررسی خواص تکنولوژیکی گونه‌های لاکتوباسیل غالب در پنیر سنتی لیقوان، فصلنامه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۱ (٤)، ٥٤٥- ٥٣٥.

رسولی پیروزیان ه، حصاری ج، فرج‌نیا ص، مقدم م، قیاسی‌فر ش، ۱۳۸۸، جداسازی و شناسایی سویه‌های انتروکوکسی غالب در پنیر سنتی لیقوان، فصلنامه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱۹ (۱)، ۲٤-۱۳.

Aquilanti L, Silvestri G, Zannini E, Osimani A, Santarelli S and Clementi F, 2007. Phenotyoic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. Journal of Applied Microbiology 103(4): 948- 960.

Ayele N, Siv A and Goran M, 2001. Randomaly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. Antonie van Leeuwenhoek 79: 1-6.

Brien J, Crittenden R, Arthur C and Salminen S, 1999. Safety evaluation of probiotics. Trends in Food Science and Technology 10(12): 418- 424.

Bulut C, 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. IYTE Thesis of MS.

Çakir I, 2003. Determination of some probiotic properties on *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Ankara University, Ph.D thesis of 88- 95.

Calicchia ML, Wang CIE, Nomura T, Yotsuzuka F and Ostato DW, 1993. Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and streptomycin resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product. Journal of Food Protection 56: 954-957.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L and Collins JK, 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. International Journal of Food Microbiology 35: 1- 27.

Chateau N, Deschamps AM and Hadj Sassi A, 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology 18: 42- 48.

Conway PL, Gorbach SL and Goldin BR, 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science 70: 1- 12.

Durme C, Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D and Hallorari S, 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *In vivo* findings. Clinical Nutrition 73(2): 386- 392.

Erkkila S and Petaja E, 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science 55: 297-300.

Fernandez MF, Boris S and Brbes C, 2003. Probiotic properties of human *Lactobacilli* strains to be used in the gastrointestinal tract. Journal of Applied Microbiology 94: 449- 455.

Garrity G, Boone M, David R and Richard W, 2004. Bergy's manual of systematic bacteriology. 4th Ed. Springer pub. Michigan.

Gilliland SE, Staley TE and Bush LJ, 1984. Importance of the bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. Journal of Dairy Science 67: 3045- 3051.

Harrigan WF and Mc Cance ME, 1976. Biochemical test for bacteria laboratory method in food and dairy microbiology. Academic Press. London. New York 33- 200.

Holzapfel WH, Guigas C and Franz C, 2002. General overview of the *Enterococci*. International Symposium on Enterococci in Foods 30- 31.

Holzapfel WH, Haberer P, Snell J, Schillinger U and Huisint Veld J, 1998. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology 41: 85- 101.

Hozapfel WH and Wood BJB, 1995. The genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional. Glasgow 235- 278.

Klaenhammer TR, 2000. Probiotic bacteria: today and tomorrow. Nutrition Journal 130: 415S- 416S.

Kim S, Yong Cho S, Song O, Shin IS, Su Cha D and Park H, 2006. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. Food Science and Technology 41(3): 493- 500.

Metchnikoff E, 1907. The prolongation of life. Optimistic studies. London: Butterworth- Heineman 161- 183.

Pennacchia C, Ercoloni D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G and Villani F, 2004. Selection of *Lactobacillus* Strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Science 67: 309- 317.

Prasad J, Gill H, Smart J and Gopal PK, 1998. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. International Dairy Journal 8: 993-1002.

Salminen S, Bouley C, Boutron MC, Cummings JH, Franck A and Gibson GR, 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. British Journal of Nutrition 80(1): S147- S171.

Isolation, biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoi city

T Narimani [1] and A Tarinejad [2 *]

Received: August 21, 2013 Accepted: April 15, 2014

[1] MSc Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
[*]Corresponding author: E mail: atarinejad@yahoo.com

Abstract
The aim of this study was to isolate and identify the probiotic bacteria from microbial flora of buffalo milk and its traditional yogurt in Khoi city. To achieve this goal, the lactic acid bacteria were isolated by phenotypic methods (cellular morphology, Gram staining, catalase test, biochemical tests including growth in different temperatures, various concentrations of salt and fermentation of different types of sugar) and their probiotic potential (resistant to stomach acid and bile salts) were evaluated. Then, to identify more accurately, the 16S rRNA gene of bacteria were replicated with pairs of specific primers and then the purified PCR product was sent for gene sequencing. At the end, 13 strains of *Lactobacilli* and 6 strains of *Enterococci* were reported as the natural microbial flora with probiotic potential in Khoi city. These bacteria provide the good quality of the dairy products in those areas and can be used in industrial manufacture of dairy products.

Key words: *Enterococci*, *Lactobacilli*, Probiotic Bacteria, 16S rRNA gene