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

بررسی خاکهای آغشته به پساب ماست‌بندی‌های محلی در شکل‌گیری احتمالی گیاهان پروبیوتیک

سعیده نجفی*[1] ـ فرزاد محمدی ابلی[1] ـ نرجس بحری[1]

1- دانشکده میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن

مسئول مکاتبات: سعیده نجفی saeedeh.najafi@yahoo.com

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی لاکتوباسیلوس های جدا شده از خاک های آغشته به پساب ماست بندی های محلی است که زیستگاه طبیعی آنها (محصولات لبنیاتی) تغییر نموده و در زیستگاه غیر اختصاصی (خاک) به سر می برند. 10 نمونه ازخاک های آغشته به پساب ماست بندی های محلی از کوه های مناطق دو هزار و سه هزار (شمال ایران) جمع آوری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه ها رقت سازی شده و به پلیت های حاوی محیط MRS و M17 منتقل شدند، کلنی های LAB با مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی و تست های افتراقی مشخص گردیدند. همچنین پتانسیل پروبیوتیکی آنها توسط تست های (تحمل اسید ، تحمل نمک صفراوی و آنتی بیوگرام) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت برای تایید بیشتر تست مولکولی 16srDNA انجام شد. در این تحقیق باکتری های: *lactobacillus coryniformis, lacto bacillus guizhouensis, lactobacillus coryniformis subspecies torokoent,* بر اساس آنالیز 16rsDNA شناسایی و جدا شدند. در پایان تحقیق مشخص شد که لاکتوباسیلوس ها به جز زیستگاه طبیعی خود قادر به زیستن در زیستگاه غیر اختصاصی نیز می باشند. از این رو می توان فرض نمود که تبادلات ژنتیکی زیادی بین باکتری های خاک و جدا شده هاصورت گرفته باشد. که این تغییر زیستگاه موجب افزایش پتانسیل پروبیوتیکی آنها شده است. پس در همزیستی خاک با این باکتری ها و با توجه به همزیستی خاک با گیاه خاک می تواند در شکل گیری گیاهان پروبیوتیک نقش داشته باشد.

کلمات کلیدی: خاک های آغشته ـ پساب ماست بندی های محلی ـ *lactobacillus coryniformis*- گیاهان پروبیوتیک

مقدمه

خاک به دلیل شرایط فیزیکوشیمیایی دارای تنوع بسیار زیادی از میکروارگانیسمهای مختلف می باشد که این میکروارگانیزمها دارای پتانسیل متابولیکی بالایی هستند. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که زمانی که به میزان مناسبی در بدن میزبان توزیع می شوند، اثرات مفیدی را برای میزبان خود فراهم می کنند(Espinoza and Navarro, 2008). از میان میکرو ارگانیسم های پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیک(*LAB*) به عنوان مهمترین گروه شناخته شده اند. باکتری های اسید لاکتیک گروه هتروژنی از باکتری های گرم مثبت هستند که بر اساس مجموعه ای از ویژگی های مورفولوژیک، متابولیک وفیزیولوژیک در یک گروه بسیار بزرگ قرار گرفته اند. هسته مرکزی این گروه بسیار بزرگ را به طور سنتی جنس های *Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus* و *Lactobacillus* تشکیل می دهند(makarova etal, 2006). باکتریهایی که در این تحقیق جداسازی و شناسایی شده اند، مربوط به باکتریهای اسید لاکتیک و متعلق به جنس لاکتوباسیلوس می باشند که جزءفلور طبیعی دستگاه گوارش و مواد غذایی تخمیر شده هستند و کاندیداهای خوبی برای پروبیوتیک بودن به حساب می آیند. لاکتوباسیل ها، میله ای شکل، گرم مثبت و بخشی از گروه بزرگ باکتریهای تولید کنندهٔ اسید لاکتیکی هستند. نقش لاکتوباسیل ها در صنعت غذا بسیار مهم ارزیابی شده است مثلاً در سرکه سازی، تولید پنیر و ماست نقش بسزایی را ایفاء می کند. *LAB* را می توان از گستره وسیعی از منابع جدا کرد. انواع دانه ها، گیاهان سبز، سبزیجات تخمیری، انواع ماهی و خاک منابعی هستند که بسته به نوع تحقیق می توانند برای جستجوی این باکتری ها مناسب باشند (kathresan and thiruneelkan, 2009). به دلیل اهمیت فوق العاده این گروه، یافتن باکتری های جدید مناسب قرار گرفتن در آن از منابع جدید و بکر از اهمیت بالایی برخوردار است. هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس های جدا شده از خاکهای اغشته به پساب ماست بندی های محلی است. که زیستگاه طبیعی آنها (محصولات لبنیاتی) تغییر نموده و در زیستگاه غیر اختصاصی (خاک) به سر می برند، که این تغییر زیستگاه موجب افزایش پتانسیل پروبیوتیکی آنها شده است و تصور ما بر این است که این باکتری ها می توانند توسط ریشه درختان حمل شوند و به وسیله حیوانات مصرف شوند. بنابراین این باکتری ها علاوه بر این که می توانند مستقیما روی خاک اثر بگذارند می توانند به صورت مستقیم و غیر مستقیم روی گیاهان و جانوران تاثیرگذار باشند.

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

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه ها: از خاک های آغشته به پساب ماست بندی های محلی از مناطق مختلف کوه های دو هزار و سه هزار تنکابن (واقع در شمال ایران) 10 نمونه به طور تصادفی جمع آوری شد و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه انتقال داده شد.

متد کشت: نمونه های جمع آوری شده رقت سازی شده و به مقدار 100 µL به پلیت های حاوی محیط MRS و M17 انتقال داده شد. پس از انجام کشت سفره ای پلیت ها برای مدت 48-24 ساعت در جار بی هوازی به همراه گاز پک Cدر دماهای 10°C, 37°C, 42°C قرار داده شدند. پس از زمان انکوباسیون، پلیت ها از جار خارج شده و بر اساس مشاهدات مورفولوژیک، کلنی های غیر مشابه مورد رنگ آمیزی گرم، تست کاتالازو تست حرکت قرار گرفتند و کلنی های میله ای و کروی از دو محیط M17 و MRS تأیید شده (گرم مثبت، کاتالاز منفی) و به صورت کلنی تک در پلیت های جدید کشت خطی داده شدند. انجام کشت خطی از کلنی های مجزا چند بار تکرار شد. انجام این کار در بررسی LAB جهت افزایش خلوص و همچنین فعال شدن ایزوله ها ضروری است.

بررسی پتانسیل پروبیوتیکی: سه تست (تحمل نمک صفراوی، تحمل اسید و آنتی بیوگرام) برای بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری های جدا شده، انجام شد.

تست تحمل اسید: از کشت شبانه ی باکتری های جدا شده در محیط MRS و M17 براث با PHهای مختلفی که با استیک اسید تغییر پیدا کرده بود، تلقیح انجام شد و به مدت 24 ساعت در جار بی هوازی در 37 °C انکوبه گردید. سپس 100 µL از هر کشت رشد یافته در MRS و M17 آگار تلقیح شد و رشد کلنی ها پس از 24 ساعت مورد مشاهده قرار گرفت و در نهایت نتایج به صورت + و = گزارش شد(nguyen and kangand, 2006).

تست تحمل نمک صفراوی: باکتری های جدا شده مقاوم در برابر اسید برای ارزیابی انتخاب شدند. از کشت 24 ساعته به محیط کشت براث حاوی 0.3% نمک صفراوی دزوکسی کولات سدیم افزوده می شود و در طول موج 600nm هر 0،15،40،60 دقیقه یک بار خوانده می شود(Gilliland and Staley and Bush, 1984).

تست حساسیت آنتی بیوگرام: حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده در این مطالعه با استفاده از روش انتشار دیسک ت عیین شد(Charteris *et al*, 2001.). برای تست انتشار دیسک، دیسک های آنتی بیوتیکی(cefotaxime (ctx 30 µg، Piperacillin(P 10µg)، Tetracycline (TE 30µg)، ciprofloxacin(CIP 5µg)، Ampicillin (AM 10µg) مورد استفاده قرار گرفت. نقاط قوت دیسک و تفسیر اندازه منطقه مطابق با کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی انجام شد.

شناسایی و تشخیص: DNA کلنی های جدا و خالص شده توسط روش فنل کلروفورم استخراج گردید. در این پژوهش تست مولکولی 16srDNA برای شناسایی باکتری ها مورد استفاده قرار گرفت. برای بدست آوردن محصول PCR دارای قابلیت انجام Sequencing یک جفت پرایمر یونیورسال 16srDNA مورد استفاده قرار گرفت. پرایمرهای Forward و Reverse، این پرایمر ها شامل: 8F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') و1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') بودند. نمونه های منتخب به عنوان شاخص مورد PCR قرار گرفتند و محصولات برای توالی یابی ارسال شدند. با دریافت توالی های مورد نظر پس از انجام sequencing، این توالی ها با استفاده از نرم افزار Blast در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov مورد بررسی قرار گرفته و بر اساس اطلاعات موجود در بانک ژنی و نتایج بررسی های مورفولوژیک شناسایی ایزوله های باکتریایی موجود، در سطح جنس و گونه انجام شد.

نتایج:

از 10 نمونه منطقه دو هزار و سه هزار، تحت شرایط بی هوازی در نهایت 3 نمونه باکتری جداسازی شد که شامل: *lactobacillus coryniformis*، *lactobacillus coroniformis subspecies torokoent*، *lactobacillus gnzhounsis*. هدف از تفکیک، شناسایی لاکتوباسیلوس ها است و برای رسیدن به این هدف باکتری ها ی جدا شده توسط روش های فنوتیپی (رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی) مورد ارزیابی قرار گرفتند و باکتری هایی که گاز، حرکت و کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند و قادر به رشد در دماهای 10°C, 37°C, 42°C برای بررسی پتانسیل پروبیوتیکی انتخاب شدند.

جدول1 : نتایج پتانسیل پروبیوتیکی باکتری های جدا شده

Bacteria		Antibiotic susceptibility						Acid tolerance					Bile tolerance			
		TIC	PIP	TE	CP	AM	CTX	5	4.5	4	3.5	3	D ≤15	40<d<15	60<d<40	D≥60
KM4	*Lactobacillus coryniformis*	S	R	S	S	S	S	+	+	+	+	+	0.112	0.122	0.210	0.222
KM7	*Lactobacillus guizhouensis*	S	R	S	S	S	S	+	+	+	+	+	0.3	0.301	0.303	0.401
KM8	*Lactobacillus coryniformis subspecies toroko*	S	R	S	S	S	S	+	+	+	+	+	0.215	0.175	0.315	0.339

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

نتایج تست آنتی بیوگرام نشان می دهد که باکتری های جدا شده فقط نسبت به Piperacilin مقاومت دارندو در ارتباط با تست تحمل اسید مشخص گردید که هر سه باکتری بالاترین مقاومت را به اسیددارند.

نتایج حاصل از تعیین مقاومت سویه ها به نمک های صفراوی بر طبق پیشنهاد ارائه شده توسط (چاتئو و همکاران 1994) که چهار گروه متمایز را بر اساس تأخیر رشد ایجاد شده بوسیلهٔ نمک های صفراوی تشخیص داده بودند(chateau and deschamp and hadjsassi, 1994)، تحلیل گردیدند.

1- سویه های مقاوم (دارای تاخیر رشدی مساوی یا کمتر از 15 دقیقه)

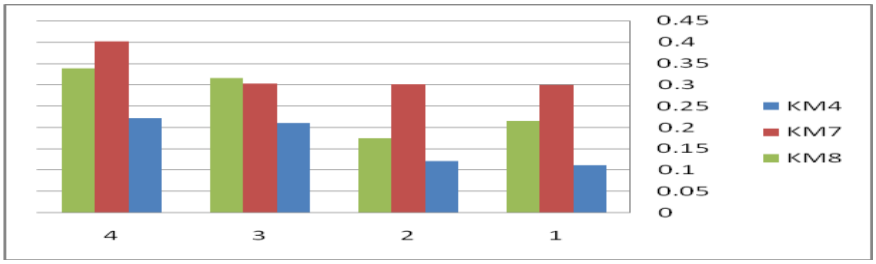
2- سویه های با تحمل بالا (تأخیر رشدی بین 15 و40 دقیقه)

3- سویه های با تحمل ضعیف (تأخیر رشدی بین 40 و60 دقیقه)

4- سویه های حساس (تأخیر رشدی بیش از 60 دقیقه)

3 باکتری تست شده، بر اساس تأخیر رشد گروه بندی شدند که نتایج در جدول 1 نشان داده شده است.

نمودار1– تحمل نمک صفرایی باکتری های جدا شده



بحث:

بررسی های انجام شده نشان می دهد که خاک آغشته به پساب ماست محلی می تواند منبع بسیاری از لاکتو باسیلوس ها باشد. در تحقیقی که در سال 1990 توسط cerning بر روی جداسازی باکتری های LAB از ماست انجام شد وی موفق به جداسازی *lactobacillus* ها شد (8). در تحقیقی که در سال 1983 توسط oda بر روی جداسازی باکتری های LAB از محصولات لبنیاتی سنتی انجام شد وی موفق به جداسازی گروه عمده ای از لاکتوباسیلوسها با پتانسیل پروبیوتیکی بالایی شد(oda et al 1983). تمام تحقیقاتی که در ارتباط با شناسایی و جداسازی باکتری های LAB انجام گرفته از محصولات لبنیاتی بوده است و تا به امروز تحقیقی بر روی خاک های آغشته به پساب ماست بندی های محلی صورت نگرفته است. با توجه به تحقیقات انجام گرفته مشخص شد که لاکتوباسیلوس های جدا شده مقاومت بالایی نسبت به اسید و نمک صفراوی دارند که این امر نشان دهنده پتانسیل بالای این باکتری ها است.

با توجه به یافته های این تحقیق و تحقیقات سایر محققین از آنجائیکه میکروارگانیزم های خاک دارای پتانسیل متابولیکی وسیعی مانند تولید آنتی بیوتیک، باکتریوسین و تولید آنزیم می باشند و از طرفی باکتری های موجود در محصولات لبنی دارای پتانسیل پروبیوتیکی بالایی هستند. با توجه به تبادلات ژنتیکی بالایی که در زیستگاهی مانند خاک بین باکتری های خاک مانند (باسیلوس ها) و باکتری های جدا شده (لاکتوباسیلوس ها) اتفاق می افتد، از این رو به نظر می رسد که میکروارگانیزم های جدا شده با پتانسیل پروبیوتیکی از چنین زیستگاه با ارزشی دارای خصوصیات بالقوه بالایی نسبت به زیستگاه اصلی خود در تولید متابولیت های با ارزشی مانند باکتریوسین و همچنین مقاومت در برابر اسید، نمک صفراوی و انتی بیوتیک ها می باشند.

مطالعات نشان می دهد که محصولات لبنی سنتی می تواند حامل بهتری برای باکتری های LAB باشد. پس در همزیستی خاک با این باکتری ها و با توجه به همزیستی خاک با گیاه خاک می تواند در شکل گیری گیاهان پروبیوتیک نقش داشته باشد. بنابراین می تواند به طور غیر مستقیم روی حیوانات و انسان ها تاثیر گذار باشد و با توجه به مطالب ذکر شده می توان این طور فرض نمود که از پساب های آغشته به محصولات لبنی حاوی باکتری های LAB می توان در آبیاری و کشت محصولات کشاورزی و صیفی جات استفاده نمود که این امر زمینه مطالعات و تحقیقات جامع تری را می طلبد.

Refrences

1. Espinoza, Y. R. and Navarro, Y. G. Non-dairy probiotic products. Food Microbiology. 2008:141.

2- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. *Comparative genomics of lactic acid bacteria. Evolutionary genomics.*2006; 103(42): 15611-15616.

3- Kathiresan K, Thiruneelakandan G. *Prospects of lactic acid bacteria of marine origin.* Indian Journal ofBiotechnology. 2009; 7: 170-177.

4.Nguyen TDT, Kang JH, Lee MS (2006).Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol.*113: 358-361.

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

6.Charteris W P, Kelly P M, Morelli L, *et al*. (2001). Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. *J Food Prot* 64(12), 2007-2014.
7. Chateau N, Deschamp AM and HadjSassi A, .1994 Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology :18.42–44
8. Cerning, J., 1990. Exocellular polysaccharidesproduced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 87: 113-130.
9. Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe and F. Tsuchiya, 1983. Antitumour polysaccharidesfrom *Lactobacillus* sp. Agric. Biol. Chem., 47: 1623-1625.