جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتریهای اسید لاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی در ماست های محلی استان یزد

نویسندگان:محمد مهدی سلطان دلال[۱]، حمیدرضا خشت زرین[۲]،مریم تاج آبادی ابراهیمی[۳]، ابوالفضل داودآبادی[۴]، محمدمهدی حکیمیان [۵]،علی اصغرصدرآبادی[۵]، محمد کاظم شریفی یزدی[۶]

۱.استاد میکروب شناسی مواد غذایی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲.کارشناسی ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳.استادیار گروه بیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزتهران

۴.استادیار گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی بابل

۵.کارشناس ارشد موسسه ملی تحقیقات واحدیزد ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۶.نویسنده مسئول:استاد گروه علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات زئونوز(بیماریهای مشترک بین و انسان و حیوان) تهران دانشگاه علوم پزشکی تهران تلفن تماس: ۰۹۱۲۳۸۷۴۸۷۳ E-mail: mksharifi@tums.ac.ir

طلوع بهداشت

دو ماهنامه علمی پژوهشی
دانشکده بهداشت یزد
سال چهاردهم
شماره: ششم
بهمن و اسفند ۱۳۹۴
شماره مسلسل: ۵۴

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۵/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۲۵

چکیده

مقدمه: استفاده روز افزون از فرآورده های لبنی صنعتی به جای سنتی ممکن است منجر به افزایش حذف باکتریهای پروبیوتیک شود. لذا این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتریهای اسید لاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی در ماست های محلی استان یزد انجام گرفت.

روش بررسی : ۹۶ نمونه ماست (۳۲ نمونه ماست بز،۳۲ نمونه ماست میش و۳۲ نمونه ماست گاو) از مناطق مختلف استان یزد جمع آوری شد. نمونه‌های ماست ابتدا در محیط MRS broth غنی سازی و سپس بر روی محیطMRS agar کشت داده شدند. برای شناسایی اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک از تست‌های گرم وکاتالاز وجهت بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شده ابتدا از تست مقاومت به اسید وسپس از تست مقاومت به املاح صفراوی استفاده شد.در ادامه شناسایی گونه باکتری‌های اسید لاکتیک توسط تست‌های بیوشیمیایی در دمای ۱۵و ۴۵ درجه سانتیگراد، هیدرولیز آرژنین و تولید گاز از گلوکز انجام گرفت.

یافته ها : ازمجموع ۹۶ نمونه ماست جمع آوری شده،۷۵ نمونه مثبت بدست آمد،که بر اساس تست‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی ۴۷ باکتری اسید لاکتیک شناسایی شدند. از این ۴۷ ایزوله لاکتیک، ۲۴ ایزوله دارای مقاومت به اسید و در مرحله بعد،۱۲ ایزوله مقاومت به صفرا را داشتند. از میان ۱۲ ایزوله با توان پروبیوتیکی، ۵ ایزوله کوکسی از گونه پدیوکوکوس اسیدلاکتیسی و ۷ ایزوله از جنس لاکتوباسیلوس که متعلق به گونه‌های ل. پلانتاروم، ل. برویس، ل. فرمنتوم و ل.کفیر بودند.

نتیجه گیری: یافته های حاصل از این مطالعه نشان از تنوع بالای اسیدلاکتیک باکتری ها در ماست های بومی استان یزد دارد.

واژه های کلیدی : باکتری های اسید لاکتیک، پروبیوتیک، ماست محلی، یزد

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی تهران است.

مقدمه

باکتری های اسید لاکتیک (Lactic Acid Bacteria)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 (۱). این گروه باکتری ها شامل (لاکتوکـوکوس، لکونـوستـوک، که میاندوست و پدیوکوکوس، استرپتوکوکوس ، لاکتوباسیلوس که گرمادوست) می باشندو به طور طبیعی در موادخام مثل شیر، گوشت و حتی در دستگاه گوارش حیوانات و انسانها نیز وجود دارد (۲،۳) باکتری هـــای اسیدلاکتیک از اعضای مطلوب میکروفلور بدن هستند و به عـلاوه این باکتریها بطور سنتی در تولیـد محصـولات لبنـی تخمیـری استفاده می شوند و از خصوصیت "بطور کلی ایمـن" (Generally recognized as safe)برخوردار می باشند(۴،۵). استفاده از باکتریهای اسیدلاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی بهترین انتخاب، نه فقط برای بالا بردن تعداد میکروبهای مفید در فرآورده های غذایی، بلکه بعنوان میکروب های سازگار طبیعی با محیط روده می باشند(۶). سویه های باکتری های اسید لاکتیک موجود در فرآورده های لبنی، دارای استفاده با سابقه تاریخی طولانی مدت هستند(۱،۶). مصرف محصولات لبنی در جهت سلامت و تغذیه انسـان هـا از مدت ها قبل متداول بوده است و فـراورده ماسـت از پرمصـرف ترین آنها به شمار می رود (۱). از آنجا که اعتقـاد بـه اثرات مفید ماسـت در سـلامتی انسـان از زمان هـای گذشـته در چندین جامعه متمدن وجود داشته است بنـابراین حضـور ایـن باکتریها در این فراورده می تواند اثـرات درمـانی آن را افـزایش دهد(۷،۸)، بطوریکه در کاهش میزان کلسترول، فعالیت ضـد میکروبـی بـر علیه پاتوژن ها، ایجاد تعادل مطلـوب در میکروفلـور طبیعـی، وکاهش عدم تحمل لاکتوز و بسـیاری عملکردهـای دیگـر نقـش بارزی دارد(۲،۵).گسترش تمایل به مصرف ماست به زمانی برمی گردد که الی مچینکف درسال۱۹۱۰در روستاهای بلغارستان مشاهده کردکه خوردن یک نوع ماست تخمیر شده از شیر سبب افزایش عمر و حفظ سلامت روستاییان می گردد (۹). با توجه به اهمیت باکتری های اسید لاکتیک ،کاربرد درصنعت وهم چنین سود آوری میلیاردی این تحقیقات ونیاز کشورها به این باکتری ها سبب تلاش کشور ها در جهت جداسازی وشناسایی گونه های بومی ومحلی شده است. بطور مثال Jokovic و همکاران در سال ۲۰۰۸ درصربستان(۱۰)،Kostinek همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشور افریقای جنوبی(۱۱)، وپژوهشگران دیگری در سرتاسر جهان به دنبال سویه های باکتری اسید لاکتیک بومی ومحلی با کاربردهای گوناگون بوده اند. در کشورمان نیز پژوهش هایی در این رابطه انجام گرفته که می توان به پژوهش های تاج آبادی وهمکاران (۱۲)، حجازی وهمکاران(۱۳)، عبدی وهمکاران (۱۴)، اشاره کرد. تنوع آب وهوای واقلیم های گوناگون کشورمان به گونه ای است که بافت ماست های سنتی تولیدشده درکشورمان از محبوبیت خاصی بـین افـراد جامعه برخوردار است. طعم ومزه خاص این محصول تخمیری در نواحی مختلف بسیار متنوع است. این امرعمدتا مربوط به میکروفلور لاکتیکی متفاوت این محصول می باشد. لذاشناسایی وایزوله کردن سویه های بکر ازمحصولات بومی

با خصوصیات حسی مطلوب می تواند سرمنشا ورود به صنعت و تولید محصولات با کیفیت ثابت ومطابق با ذائقه مصرف کنندگان گردد. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتریهای اسید لاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی در ماست های محلی استان یزد بوده است.

روش بررسی

این مطالعه از نوع توصیفی مقطعی و در طی مدت هیجده ماه (۱۳۹۳-۱۳۹۲)، بر روی نمونه های اخذ شده از ماستهای محلی مناطق مختلف استان یزد جهت جداسازی،شناسایی بیوشیمیایی باکتری های اسید لاکتیک با پتانسیل پروبیوتیکی انجام گرفت.

جمع آوری نمونه ها: ۹۶ نمونه ماست محلی شامل ۳۲ نمونه ماست بز، ۳۲ نمونه ماست میش و ۳۲ نمونه ماست گاو) از مناطق مختلف استان یزد با شرایط استریل ودر ظروف مخصوص جمع آوری وسپس بارعایت دمای یخچالی در کمترین زمان به آزمایشگاه موسسه ملی تحقیقات واحد یزد منتقل گردید. کدگذاری نمونه هابراساس نوع گونه حیوانی (بز،میش وگاو)ومنطقه جمع آوری نمونه(یزد، ندوشن، اردکان، ابر کوه، میبد، تفت و بافق) انجام گرفته است.

به منظور غنی سازی اولیه ۱۵ گرم از هر نمونه به۲۰۰ cc محیط MRS broth (شارلو- اسپانیا) حاوی۵ U/ml نیستاتین تلقیح و در شرایط بی هوازی (۵٪ Co2) و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ الی ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری گردید. سپس از محیط های گرمخانه گذاری سریال رقت تهیه و ۱۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی پلیت حاوی محیط MRS Agar (شارلو- اسپانیا) به صورت پورپلیت کشت و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط بی هوازی (۵٪ Co2) گرمخانه گذاری گردید.

پس از پایان گرمخانه گذاری پلیت ها را بررسی وکلنی های با مورفولوژی متفاوت از محیط جدا وخالص سازی شدند. ابتدا بر روی هر کلنی خالص بدست آمده، آزمون رنگ آمیزی گرم وتست کاتالاز صورت گرفت. پس از اطمینان از گرم مثبت وکاتالاز منفی بودن کلنی یا جدایه مورد نظر، خصوصیات مورفولوژی سلولی در زیر میکروسکوپ بررسی شد و باسیل یا کوکسی بودن آن تایید گردید و سپس توسط تست های کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (استاندارد ۲۳۲۵). کوکسی های گرم مثبت، کاتالاز منفی هموفرمنتاتیو با آرایش سلولی تتراد به عنوان پدیوکوکوس و باکتری های میله ای گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان لاکتوباسیلوس بررسی شدند.

جهت بررسی مقاومت به اسید،ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک به مدت ۴۸ ساعت در محیط MRS broth کشت داده شدند و کدورت آنها برابر استاندارد شماره 3 مک فارلند تنظیم گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون میکروبی به محلول PBS(Phosphate-Buffered-Saline) با pH ۲/۵ تلقیح شد و به مدت ۳ ساعت گرمخانه گذاری گردید. در زمان تلقیح و ۳ ساعت بعد ازگرمخانه گذاری ۵۰ میکرولیتر از محلول PBS، بر روی محیط MRS agarبصورت پورپلیت کشت و به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در شرایط بی هوازی (۵% Co2) گرمخانه گذاری گردیدند. بعد از طی این مدت و تعیین درصد بقاء، ایزوله های

با $CFU \geq 10^6$ به عنوان مقاوم به اسید در نظر گرفته شدند. ازسوش لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC 1058) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

جهت بررسی مقاومت به نمک های صفراوی، ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک به مدت ۲۴ ساعت در محیط MRS broth کشت داده شدند و ده میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی به ۹ میلی لیتر محیط MRS broth حاوی صفرای ۰.۳٪ (oxgall) و محیط کشت MRS broth فاقد صفرا (بعنوان کنترل) اضافه شد. محیط‌ها به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در شرایط بی هوازی (۵% Co2) گرمخانه‌گذاری شدند. جذب نوری محیط‌ها در ابتدا و پس از پایان گرمخانه گذاری در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. با استفاده از فرمول استاندارد میکروارگانیسم های پروبیوتیک (مصوبه کمیته سیصد و چهل وششم بیولوژی سازمان استانداردایران) ایزوله ها با ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۴ به عنوان مقاوم به صفرا شناسایی گردیدند.

شناسایی فنوتیپی و بیوشیمیایی ایزوله های مقاوم براساس تست های رایج مطرح شده در کتاب برگی انجام گرفت. از آزمون های رشد در دماهای ۱۵ ۴۵ درجه سانتیگراد، تولید گاز از گلوکز با استفاده از محیطMRS broth حاوی لوله دورهام معکوس، هیدرولیز آرژنین استفاده شد. همچنین الگوی تخمیر کربوهیدراتها شامل ۱۲ قند (آرابینوز، سوکروز، سوربیتول، رافینوز، ترهالوز، ملی بیوز، مانوز، مانیتول، مالتوز، لاکتوز، گالاکتوز، سلوبیوز) در محیطMRS broth با ترکیب عصاره گاوی ۱۰ گرم، پروتئاز پپتون ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۴ گرم، سدیم استات ۵ گرم، دی آمونیوم سیترات ۲ گرم، سولفات منیزیوم ۰.۲ گرم، سولفات منگنز ۰.۰۵ گرم، دی پتاسیم فسفات ۲ گرم، Tween 80 یک سی سی، پودر بروموکروزل پورپل ۰.۰۵ گرم در لیتربه عنوان محیط پایه قندی انجام شد.کربوهیدرات ها (۱۲ قند) به عنوان منابع کربن به صورت جداگانه و با فیلتر استریل و با غلظت نهایی ۱٪ به محیط اضافه گردیدند. نتایج بر اساس تغییر رنگ معرف فنل از قرمز به زرد ارزیابی و در حالت مثبت و منفی ثبت گردید.

یافته ها

از مجموع ۹۶ نمونه ماست جمع آوری شده،۷۵ نمونه (۷۸٪) برای لاکتوباسیلوس مثبت شد. در مجموع ۲۴۶ ایزوله شناسایی و بر اساس کتاب برجی شناسایی شدند(۱۵).

از مجموع ۲۴۶ ایزوله از ماست جمع آوری شده، بر اساس تست-های فنوتیپی و بیوشیمیایی، ۴۷ باکتری گرم مثبت وکاتالاز منفی شناسایی گردیدکه از این تعداد ایزوله ها ۱۷ایزوله به باکتری اسید لاکتیک کوکسی شکل و۳۰ ایزوله باسیلی شکل تعلق داشت. (جدول۱).

غربالگری در محیط معدنیPBS با pH برابر ۲. ۵ به مدت ۳ ساعت منجر به جداسازی ۲۴ ایزوله با $CFU \leq 10^6$از هفت منطقه شهری وروستایی استان یزدگردید. مطابق با جدول ۱ (تعیین درصد بقاء) ایزوله ها به ۳ گروه حساس، نیمه مقاوم و بسیار مقاوم تقسیم شدند.

۱۸ ایزوله با مقاومت بالای ۶۹ درصد، ۵ ایزوله با مقاومت بین ۱۰ تا ۶۰ درصد و ۱۶ ایزوله نیز حساس بوده وهیچ گونه رشدی را پس از سه ساعت نشان ندادند.

جدول۱: تعیین درصد بقاء ایزوله ها در pH = 2/5 به مدت 3 ساعت

تعداد کل نمونه جمع آوری شده	تعداد لاکتیک اسیدهای متحمل اسید	ماست براساس گونه مختلف	تعیین جمعیت بعد از تیمار اسیدی		
			کمتراز ۱۰٪ $\leq ۱۰^{۴}$	از ۱۰تا۶۰٪ $۱۰^{۵} \leq x \leq ۱۰^{۶}$	بیش از ۶۰٪ $\geq ۱۰^{۷}$
۳۲	۱۸	میش	۵	3	10
۳۲	۱۷	بز	۱۱	2	4
۳۲	۱۲	گاو	۶	2	4

بر اساس این نتایج ۵ ایزوله ازماست بز ومیش شهرستان ندوشن و ۲ ایزوله ازماست گاوی شهرستان اردکان وتفت مقاومت بسیار خوبی(بیش از ۶۰ درصد) را دارا بودند.

بررسی ایزوله های مقاوم به نمک های صفراوی: ۲۴ ایزوله که درصد بقاء بهتری را در محیط اسیدی نشان دادند میزان تحملشان به نمکهای صفراوی بررسی شد. نتایج حاصل مطابق با استاندارد میکروارگانیسم های پروبیوتیک (مصوبه کمیته سیصد وچهل و ششم بیولوژی سازمان استاندارد ایران) محاسبه گردیده ودر نهایت ۱۲نمونه با ضریب بازدارندگی کمتر از ۰/۴ (Cinh ≥ ۰/۴) به عنوان مقاوم تلقی وجهت شناسایی جنس وگونه جداسازی گردیدند(جدول۲).

بررسی مقاومت توانایی رشد در حضوراملاح صفراوی ایزوله هامطابق با جدول۲ نشان می دهد ایزوله های جدا شده ازماست گونه بز و میش شهرستان ندوشن وماست گونه گاوی شهرستان های یزد واردکان مقاومترین ایزوله ها به املاح صفراوی هستند.

این ایزوله ها با در نظرگرفتن نتایج آزمون مقاومت به شرایط اسیدی، با جمعیتی بالا مقاوم ترین ایزوله ها به شرایط اسیدی نیز می باشند.

از این رو به نظر می رسدکه این ایزوله ها تحمل شرایط فیزیکو شیمیایی سیستم گوارشی را داشته و پس از مصرف توانایی زنده مانی در سیستم گوارشی رادارند.

بررسی نتایج این دو آزمون نشان از پتانسیل پروبیوتیکی بالای ایزولهء جداشده از ماست گونه حیوانی بزدر شهرستان ندوشن و ایزوله های های ازگونه گاو در شهرستان های اردکان و یزد دارد.

از بین ۱۲ ایزوله مقاوم به اسید وصفرا (شاخص های پروبیوتیکی)،۵ ایزوله به عنوان پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی شناسایی شدند. همچنین ۷ ایزوله به عنوان گونه لاکتوباسیلوس برویس(۲ ایزوله)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم(۳ ایزوله)، لاکتوباسیلوس کفیر و لاکتوباسیلوس فرمنتوم شناسایی شد(جدول۳).

جدول ۲ :تحمل صفرا در محیط کشت MRS با افزودن ۰/۳٪ درصد oxgal

کد نمونه	حداکثر رشد در nm ۶۰۰ (فاقد بایل)	زمان (ساعت)۳/ واحد افزایش در nm ۶۰۰	Cinh
۸ (گاو،ندوشن)	۰/۱۶۳	۰/۳۱۱	۰/۹۳
۱۳ (بز،ندوشن)	۰/۳۱۱	۰/۳۸۶	۰/۲۴
۱۴ (بز،ندوشن)	۰/۷۳	۰/۱۳۲	۰/۸۱
۲۳/۱ (میش،ندوشن)	۰/۲۳۰	۰/۴۲۹	۰/۸۷
۲۳/۲ (میش،ندوشن)	۰/۵۲۰	۰/۴۶۳	۰/۴۰
۲۳/۳ (میش،ندوشن)	۰/۲۵۵	۰/۴۳۷	۰/۷۱
۲۵ (بز،ندوشن)	۰/۳۰۵	۰/۳۱۲	۰/۰۲
۲۷ (بز،ندوشن)	۰/۲۵۵	۰/۲۴۱	۰/۰۵
۴۷ (میش،ندوشن)	۰/۷۷	۰/۱۴۷	۰/۹۱
۴۹ (میش،ندوشن)	۰/۱۰۰	۰/۱۸۴	۰/۸۴
۵۰ (گاو،یزد)	۰/۲۵۷	۰/۲۷۹	۰/۰۹
۵۱ (گاو،یزد)	۰/۵۲۰	۰/۴۹۸	۰/۰۴
۵۲ (گاو،یزد)	۰/۲۰۳	۰/۳۲۶	۰/۶۱
۶۵ (میش،ابرکوه)	۰/۹۵	۰/۲۴۳	۰/۵۱
۷۱ (گوسفند،ندوشن)	۰/۲۲۱	۰/۳۴۵	۰/۵۶
۷۲ (گاو،تفت)	۰/۵۱۲	۰/۵۲۲	۰/۰۱
۷۴ (گاو،اردکان)	۰/۶۵۰	۰/۶۱۴	۰/۰۶
۷۵ (گاو،اردکان)	۰/۸۳	۰/۱۴۱	۰/۷۰
۷۸/۱ (میش،اردکان)	۰/۲۰۵	۰/۲۳۱	۰/۱۳
۷۸/۲ (میش ،اردکان)	۰/۱۵۰	۰/۲۸۳	۰/۸۹
۸۲ (میش ،ندوشن)	۰/۷۲	۰/۱۳۹	۰/۹۰
۸۶ (میش ،ندوشن)	۰/۸۵۸	۰/۵۶۷	۰/۳۴
۹۰ (میش ،ندوشن)	۰/۴۰۳	۰/۳۰۴	۰/۲۵
۹۲ (بز،ندوشن)	۰/۲۲۰۳	۰/۱۳۵	۰/۳۸
Plantarom*L. (استاندارد)	۰/۱۹۳	۰/۱۲۴	۰/۳۵

PTCC:1058*

جدول ۳: توزیع پراکندگی باکتری های لاکتیک بر حسب نوع حیوان و شهر

نوع باکتری	نوع حیوان	شهر	تعداد
لاکتوباسیلوس کفیر	بز	ندوشن	۱
لاکتوباسیلوس برویس	بز	ندوشن	۱
لاکتوباسیلوس برویس	گوسفند	ندوشن	۱
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	بز	ندوشن	۱
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	گاو	یزد	۱
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	گاو	اردکان	۱
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	گوسفند	ندوشن	۱
پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی	گوسفند	ندوشن	۱
پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی	گاو	یزد	۱
پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی	گاو	تفت	۱
پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی	گاو	اردکان	۱
پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی	بز	ندوشن	۱

بحث و نتیجه گیری

براساس واکنشهای بیوشیمیایی، مقاومت به اسید و نمکهای صفراوی بیشترین باکتری های پروبیوتیک (۵۸/۳۳٪) از مناطق روستایی شهرستان ندوشن جداسازی گردیدند. با تعیین تحمل شرایط اسیدی و مقاومت در برابر نمک های صفراوی می توان اختلاف ایجاد شده در بین سویه های پروبیوتیک را بررسی نمود. همچنین، محدوده pH در بقاء باکتریهای اسید لاکتیک اهمیت فروانی دارد که با روشهای متعددی می توان باکتریهای مقاوم به اسید را جداسازی نمود. با انجام آزمایش تیمار اسیدی نشان داده شد که ایزوله های جدا سازی شده از ماست های مناطق مختلف استان یزد توانایی بالایی در تحمل به شرایط اسیدی با pH(۲.۵) داشتند وتوانستند در این شرایط به خوبی رشد کنند. بارجوع به جدول ۱ نتایج نشان دهنده مقاومت بالای ایزوله های جداسازی شده از ماست گونه گوسفندی مناطق روستایی وعشایری ندوشن با مقاومت بیش از۶۰ درصداست. در بررسی حاضر توانایی رشددر(pH(۲/۵ بین ایزوله های جداسازی شده متفاوت بوده بطوریکه گونه های لاکتوباسیلوس ها نسبت به پدیوکوکوس ها از مقاومت بیشتری برخوردار بودند. بومباوهمکارانش نشان دادند که توانایی رشد درpH پائین بین باکتری های اسید لاکتیک متفاوت است، بطوریکه لاکتوباسیلوس ها نسبت به سایر گونه های مورد بررسی مقاومت بیشتری را نشان دادند(۱۶). نتایج این بررسی با مطالعه حاضر همخوانی دارد. باکتری های اسید لاکتیک، اسید دوست بوده که به معنی تحمل آن ها به pH پایین است. (۱۷،۱۶). بنابراین تحمل به شرایط اسیدی یک معیار مهم در انتخاب باکتری پروبیوتیک برای اطمینان بقا و قابلیت های خود در نظر گرفته می شود. علاوه بر این، باکتری های پروبیوتیک مقاومت متغیر به

شرایط اسیدی از خود نشان می دهند، و این ویژگی به گونه ها و سویه وابسته است (۱۷،۱۸). نهایتا با بررسی شرایط اسیدی برروی ۴۷ ایزوله کاتالاز منفی وگرم مثبت ۲۴ ایزوله (۱۵ جنس لاکتوباسیلوس و ۹ جنس پدیوکوکس) شناسایی گردید. در تحقیقی که فرحبخش وهمکاران در سال ۱۳۹۲ انجام دادند، از ۴۰ نمونه ماست محلی منطقه رفسنجان،۳۸ نمونه باکتری اسید لاکتیک متحمل شرایط اسیدی جداسازی گردید که ۳۳ سویه آن جنس لاکتوباسیلوس بودند(۱۹). همچنین در مطالعه ای که فرقانی وهمکاران در سال ۱۳۸۹ برروی محصولات لبنی ارتفاعات البرز انجام داده اند،۶جنس لاکتوکوکوس انتروکوکوس، استرپتوکوکوس ، لکونوستوک ،لاکتوباسیلوس وپدیوکوکس جداسازی وشناسایی کردند که لاکتوباسیلوس واسترپتوکوک جنس های غالب بودند (۲۰).نتایج مطالعه ما نیز با مطالعات فوق همخوانی دارد.باید به این نکته توجه نمود که اصولا بر حسب نوع ماده غذایی، آب و هوای اقلیمی و شرایط تغذیه ای و محیطی نوع و گونه باکتری های لاکتیک اسید متفاوت از یکدیگر می باشد. همین دلیل نشان دهنده اهمیت جستجو وشناسایی باکتری های لاکتیک اسید در منابع و نقاط مختلف متفاوت می باشد تا گونه های بومی هر منطقه که خاص ساکنان همان منطقه است شناسایی شوند(۱۷).

باکتری های پروبیوتیک بعد از تحمل شرایط اسیدی باید به نمک های صفراوی روده نیز مقاوم باشند،تادر سیستم گوارشی دوام بیاورند.پس باید غلظت محیط استفاده شده تقریبا با غلظت نمک های صفراوی در روده یکسان باشد. به همین منظور از محیط کشت با ۰/۳ درصد oxgal استفاده گردید. با بررسی ضریب بازدارندگی(Cinh)، ۱۲ ایزوله مقاوم به نمک های صفراوی از ۲۴ ایزوله شناسایی گردید. این نتایج مقاومت بیشتر لاکتوباسیلوس ها نسبت به پدیوکوکوس هارا نشان داد.در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۴ میلادی توسط چاتئو و همکاران انجام شد، تأثیر نمک های صفراوی بر روی رشد38سویه لاکتوباسیلوس استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مورد آزمایش قرار دادند وحداقل ۵۰ درصد سویه های مقاومت بالایی نسبت به نمک های صفراوی نشان دادند و تأثیر قابل توجهی در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک های صفراوی مشاهده کردند(۲۱). یافته های مطالعه حاضر در آزمایش سویه های انتخاب شده نسبت به نمکهای صفراوی با مقاومت بیش از ۵۰ درصد سویه ها با یافته های موجود در مطالعه ایشان مطابقت داشت. در این بررسی از ۲۴ سویه تحت آزمایش مقاومت به نمک های صفراوی، ۱۲ ایزوله با مقاومت های متفاوت جداسازی گردید.

اهمیت تعداد قند ها و نوع آنها در شناسایی باکتری های اسید لاکتیک متفاوت می باشد، مثلا برخی مانند چاماس از کیت API استفاده نموده و برخی دیگر بدون کیت تخمیر قند هارا مورد بررسی قرار داده اند(۲۲). جعفری وهمکاران درسال ۱۳۹۱ برای شناسایی تخمیر ۱۷ قند سوکروز، سوربیتول، لاکتوز،گالاکتوز، ترهالوز، فروکتوز، آرابینوز، رامنوز، سالیسین، گلوکز،اینوزیتول، مالتوز، مانوز، مانیتول، گزیلوز، رافینوز و سلوبیوز را بررسی نمودند(۲۳). Fitzsimons در سال ۱۹۹۹ برای شناسایی تنها تخمیر هشت قند گلوکز، رامنوز، سلوبیوز، ملیبیوز،

مانیتول، ریبوز، رافینوزو مـانوز را آزمـایش کـردند (۲۴). بنیادی و همکارانش درسال۱۳۸۹ از۱۲ قند: لاکتور ، ریبوز ، آرابینوز ، گالاکتوز ، گلوگز ، گلوگونات ، مالتوز، ملزیتوز، ملبیوز، رامنوز، سوربیتول، تره هالوز، گزیلوز،فروکتوز، سلوبیوز، مانیتول، ساکارز، مانوز استفاده نمودند(۲۵). در این مطالعه تخمیر ۱۲ قند مورد بررسی قرارگرفت که نتایج حاصل ازآزمایشات بیوشیمیایی وشناسایی گونه های مربوطه، شباهت ۹/۹۹ درصدی با جدول برگی را نشان می دهد (۲۶). این نتایج با پژوهش احمدی وهمکاران درسال ۱۳۸۸که باهدف جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از پنیرهای لیقوان صورت گرفت وتخمیرمتفاوت قند فروکتوز رادر دوگونه پدیوکوکوس اینوپیناتوس مشاهده نمود، منطبق است (۲۷). نتایج حاصل با توجه به نمودار1، نشان از وجود جنس پدیوکوکس در ماست انواع گونه های حیوانی(گاو، میش وبز) بود.علاوه براین لاکتوباسیلوس ها نیزبا تنوع بالا در ماست گونه های حیوانی گوسفند وبز شناسایی گردیدند. نتایج این پژوهش، وجود باکتری های اسید لاکتیک خصوصا گونه های لاکتوباسیلوس ها (برویس، پلانتاروم وفرمنتوم) رادر ماست های محلی مناطق روستایی مانند پژوهش هایی که توسط فرح بخش وهمکارانش درسال۱۳۹۱ درمنطقه روستایی رفسنجان (۱۹)، وهمچنین وجود گونه های پدیوکوکوس (پنتاساکئوس، دامنوس و پاروالوس) در محصولات لبنی که توسط Ayad و همکاران درسال۲۰۰۴ انجام گرفته را تائید می کند (۲۸).

پژوهش خمیری وهمکاران درسال ۱۳۸۸ که باهدف جداسازی باکتری های اسید لاکتیک از پنیرهای لیقوان صورت گرفت وتخمیرمتفاوت قند فروکتوز رادر دوگونه پدیوکوکوس اینوپیناتوس مشاهده نمود، منطبق است(۲۷). نتایج حاصل با توجه به نمودار۱، نشان از وجود جنس پدیوکوکس در ماست انواع گونه های حیوانی(گاو،میش وبز) بود.علاوه براین لاکتوباسیلوس ها نیزبا تنوع بالا در ماست گونه های حیوانی میش وبز شناسایی گردیدند. نتایج این پژوهش، وجود باکتریهای اسیدلاکتیک خصوصا گونه های لاکتوباسیلوس ها(برویس، پلانتاروم وفرمنتوم) رادر ماست های محلی مناطق روستایی مانند پژوهش هایی که توسط فرح بخش و همکارانش در سال ۱۳۹۱ در منطقه روستایی رفسنجان(۱۹)، و همچنین وجود گونه های پدیوکوکوس (پنتاساکئوس، دامنوس و پاروالوس) در محصولات لبنی که توسط Ayad و همکاران درسال۲۰۰۴ انجام گرفته را تائید می کند(۲۸). مقبولیت محصولات لبنی شهرستان ندوشن در بین مردم استان یزد حاصل تنوع میکروبی بالا با پتانسیل پروبیوتیکی وتغییرات ارگانولپتیکی است،که موجب ایجاد رایحه و طعمی متفاوت می گردد.بنابراین ویژگیهای ارگانولپتیکی این محصولات باعث پذیرش بهتری در این نوع فراورده ها در مقایسه با فراورده های مشابه می شود.همچنین استفاده از گونه های پروبیوتیکی استخراج شده از ماست های محلی در صنایع مختلف استان وکشور خصوصا صنایع لبنی به عنوان استارترمی تواندکاربرد داشته باشد.

تشکر وقدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروب شناسی موادغذایی دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد۲۰۳۷۹ می باشد. بدینوسیله

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می باشند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

همچنین از همکاران معاونت غذا ودارو وآزمایشگاه کنترل مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به خاطر همکاری صمیمانه در انجام این پژوهش قدردانی می گردد.

References

1- Salminen S, Von Wright A, Ouwenhand A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.2004;pp:225-230.

2- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E,et al.Comparative genomics of lactic acid bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Oct 17;103(42):15611-6.

3-Liu SQ. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. Int J Food Microbiol. 2003 Jun 15;83(2):115-31.

4- Ocaña VS, Elena Nader-Macías M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a Lactobacillus bacteriocin. Methods Mol Biol. 2004;268:347-53.

5- Topisirovic L, Kojic M, Fira D, Golic N, Strahinic I, Lozo J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. Int J Food Microbiol. 2006 Dec 1;112(3):230-35.

6-Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. Int Dairy Journal.1998; 8: 487-90.

7-Shirzadi A, Yasini Ardakani SA. The survey of survival of probiotic Bifidobacterium bifidum and its effect on microbial and physiochemical of fruit drinking yogurt. Life Science Journal 2013;10(1): 2682- 84.

8- Hlivak P, Odraska J, Ferencik M, Ebringer L, Jahnova E, Mikes Z. One-year application of probiotic strain Enterococcus faecium M-74 decreases serum cholesterol levels. Bratisl Lek Listy. 2005;106(2):67-72.

9- McGuire MK, McGuire MA. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? Adv Nutr. 2015 Jan 15;6(1):112-23.

10- Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, JovcicB, Savic D, Topisirovic L. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. Int J Food Microbiol. 2008 Oct 31;127(3):305-11.

11- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Pinto C, Egounlety M, Sossa C, et al Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. Int J Food Microbiol. 2007 Mar 20;114(3):342-51.

12-Tajabadi M, Hejazi M A, Noori A. Studying the Probiotic Characteristics of Lactobacillus spp. Isolated from Lighvan fermented dairy products. Tarbiat Moallem Univ J Sciences. 2009; 7: 4-9.[persian]

13- Lotfi H, Hejazi MA, Maleki zanjani B, Barzegari A. Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Potentiallly Probiotic Bacteria from Traditional Dairy Products from Heris and Sarab Regions. Res J Food. 2010;3(1):1–17.

14- Abdi R, Sheikh Zeinoddin M, Soleimanian Zad S. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian Lighvan cheese. Pak J Biol Sci. 2006;9(1):99–103.

15- Paul DV, George MG, Dorothy J, Noel RK, Wolfgang L, Fred AR, Karl-Heinz S, WilliamBW. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag, New York. USA. 2nd ed. Vol 3, p 465-511.

16- Bomba A, Kravjansky I , Kastel R , Herich R, Juhasova Z, Cizek M. Inhibitory effects of lactobacillus casei upon the adhesion of enterotoxige Escherichia coli K99 to the intestinal mucosa in gnotobiotic lambs. Small Rumi Rsearch.1996; 23: 199-206.

17- Davoodabadi A, Soltan Dallal MM, Rahimi ForoushaniA, Douraghi M, Sharifi Yazdi MK, Amin Harati F. Antibacterial activity of Lactobacillus spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. Anaerobe 2015;34: 53-8.

18- Park YS, Lee JY, Kim YS,Shin DH. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi, Jour.Agricultural andFood Chemistry. . 2002; 50: 2531–2536.

19- Farahbakhsh M, Hakimi H, Bahram Abadi R, Zolfaghari MR, Doraki N. Isolation of Probiotic Lactobacilli from Traditional Yogurts Produced in Rural Areas of Rafsanjan and their Antimicrobial Effects. Rafsanjan Uni Med Science. 2011;12(9):733-46. [Persian]

20- Forghani F , Nazemi A , b sharifi SH , Eskandari M. Isolation and molecular identification of Lactic Acid Bacteria from raw milks of central Alborz resolution melting real-time and 16SrDNA PCR Sequencing. Microbial Biotech J. 2011;4 (12):1-6. [Persian]

21-Chateau N, Deschamps A M,HadjSassi A. Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. Lett Appl Microbiol. 2008;18(1):42–44.

22- Chammas GI, Saliba R, Corrieu G, BealC. Characterisation of lactic acidbacteria isolated from fermented milk "laban". Int J Food Microbiol. 2006 Jul 1;110(1):52-61.

23- Jafary B, Monady A, Rezaei A, Alizadeh S, Ahmadizadeh Ch, Barzagary A and etal. Evaluation of potential probiotic enterococci isolated from traditional dairy products of the Magi and Meshkinshahr. Islamic Azad UniversTabriz Vet J. 2011; 6(1) :32-38. [Persian].

24- Fitzsimons NA, CoganTM, Condon S, Beresford T. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Appl Environ Microbiol. 1999 Aug;65(8):3418-26.

25- Bonyady M,Ostad Rahimi M, Nahaei MR, Akbary Dibavar M, Mirzaei F. Abundance Lactobacillus strains in the material food city of east Azerbaijan. J Lab Med. 2009; 4 (2):165-170.[Persian]

26- William BW. Bergey's manual of systematic bacteriology. 3 rd ed. New York: Springer Dordrecht Heidelberg; 2009: 657.

27-Ahmadi SM, Khamiri M, Khosroshahy A, Khashaninejad M. Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional cheese Lighvan. J Agri Sci.2008; 6(16):62-68.[Persian]

28- Ayad EH E, Nashat S, El-Sadek N, Metwaly H, El-Soda M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. Food Microbiol.2004; 21: 715-25.

Isolation and biochemical identification of potentially Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt in Yazd province

Soltan Dallal MM(Ph.D)[1],Khesht Zarrin HR(M.Sc)[2],Tajabadi Ebrahimi M(Ph.D)[3],Davoodabadi A(Ph.D)[4],Hakimian MM(M.Sc)[5],Sadrabadi AA(M.Sc)[5],Sharifi Yazdi MK(Ph.D)[6]

1.Professor of Food Microbiology, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2.M.Sc, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Central Tehran Branch,Tehran,Iran.
4. Assistant Professor, Department of Microbiology, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
5. M.Sc, National Institute for Health Research, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
6. Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, Zoonosis Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Introduction: The increasing use of industrial dairy products instead of traditional might resulted in elimination of probiotic bacteria. The purpose of this study was isolation and biochemical identification of potentially Probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt produced from milk of goat, cattle and sheep in Yazd province.
Methods: 96 yogurt samples ,33 each from goats ,sheep and cow were collected from different parts of Yazd province. Samples were enriched in MRS broth, and then cultured on MRS agar.Suspected colonies were primary tested for catalase and gram stain. Lactic acid bacteria with probiotic characteristics were identified with biochemical tests including fermentation of carbohydrates, grown at 15 and 45 ° C, hydrolysis of arginine, gas production from glucose and their probiotic activity were investigated by means of resistance to acid and bile.
Results: In general out of 75 positive samples, 47 were identified as lactic acid bacteria on the bases of phenotype and biochemical tests, in which 24 were resistance to acid and out of these 12, were resistant to bile, which had a probiotics potential. Five of them were identified as Pediococcus acidilacticii, and isolated from Sheep and goat yogurt. Another 6 probiotic isolates belonged to the genus Lactobacillus and included as L. plantarum, L. brevis, L. fermentom and L. kefiri and isolated from goat and sheep yogurt Yazd province.
Conclusion: The findings of this study indicate high diversity of lactic acid bacteria in traditional yogurt in Yazd province

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotic, yogurt, local, Yazd