مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۴، شماره ۳، پائیز ۱۴۰۰
ISSN ۲۷۱۶-۹۸۰۴ الکترونیکی، ISSN ۲۷۱۷-۰۶۳۲ چاپی

ارزیابی پتانسیل پروبیوتیکی و ایمنی سویه‌های اسید لاکتیکی جدا شده از محصول لبنی آغوز

20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6

بابک حق شناس[۱]، امیر کیانی[۲] و یوسف نامی*[۳]

۱- استادیار، مرکز طب بازساختی، پژوهشکده فناوری های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۲- دانشیار، مرکز طب بازساختی، پژوهشکده فناوری های سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ایران
y.nami@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۳، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۸
صفحه ۶۰-۳۷

چکیده

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به مقدار کافی، اثرات سلامتی‌بخش آشکاری در مصرف‌کننده نشان می‌دهند. این مطالعه با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیت پروبیوتیکی سویه‌های LAB موجود در محصول لبنی آغوز استان کرمانشاه انجام گرفته است. تحمل سویه‌ها در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی شامل pH پایین، نمک صفراوی ۰/۳ درصد و شرایط آنزیمی، و همچنین فعالیت آنتاگونیستی بر ضد ۸ بیماری‌زا ارزیابی شد. همچنین سویه‌ها از نظر فعالیت همولیتیکی، ظرفیت چسبندگی به فاز آبگریز، پتانسیل اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، کارآیی حذف کلسترول، توانایی تجمع خودکار و مشترک، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن‌های رمزکننده عوامل بیماری‌زا مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که سویه‌های *Lactococcus lactis* A11 و *L. lactis* A21، سویه‌هایی ایمن، دارای تحمل بالا به pH پایین و نمک صفراوی در شرایط گوارشی، فعالیت ضد بیماری‌زایی مطلوب، آبگریزی سطح سلولی قابل قبول، چسبندگی سلولی بالا، جذب کلسترول بیشتر، تجمع خودکار و مشترک ایده‌آل و حساسیت آنتی‌بیوتیکی قابل قبول بوده و می‌توان آنها را به‌عنوان سویه‌های جدید پروبیوتیک برای کاربرد در صنایع غذایی در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، باکتری اسید لاکتیک، آغوز، فعالیت آنتاگونیستی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

مقدمه

پروبیوتیک‌ها عوامل فعال میکروارگانیسمی هستند که اثرات مفیدی بر روی سلامت مصرف‌کننده نشان می‌دهند. اثرات درمانی اثبات شده‌ی پروبیوتیک‌ها شامل افزایش جذب مواد مغذی، کاهش کلسترول خون، کاهش شدت سندرم روده تحریک پذیر، درمان اسهال مرتبط با آنتی‌بیوتیک و خواص ضد سرطانی آن‌ها است. بنابراین با توجه به مزایای این میکروارگانیسم‌های مفید، در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تولید و تجاری‌سازی پروبیوتیک‌ها انجام شده است (Kouhi et al. 2021). پروبیوتیک‌ها به‌طور عمده به گروه باکتری‌های اسید لاکتیک (lactic acid bacteria: LAB) تعلق دارند. *لاکتوباسیلوس (Lactobacillus)*، *بیفیدوباکتریوم*، *لاکتوکوکوس (Lactococcus)* و *انتروکوکوس (Enterococcus)* معروف‌ترین سویه‌های پروبیوتیک متعلق به گروه LAB هستند که مجوز استفاده در محصولات دارویی و غذایی را دریافت کرده‌اند. از آنجایی‌که باکتری‌های گروه LAB به‌عنوان میکروارگانیسم‌های ایمن شناخته می‌شوند، بنابراین سویه‌هایی از این گروه که از منابع غذایی مانند لبنیات تخمیری جدا می‌شوند، می‌توانند به‌عنوان سویه پروبیوتیک معرفی شوند (Noori et al. 2013). محصولات لبنی سنتی به‌دلیل مزایای فراوان مانند بهبود جذب مواد مغذی، غیرفعال‌سازی سموم و فعالیت ضد بیماری‌زایی در سراسر جهان تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین، تنوع بالایی از لبنیات سنتی مانند ترخینه، کشک، شیراز (نوعی محصول لبنی مورد استفاده در غرب کشور)، ماست، کشک، آغوز، دوغ و پنیر به‌عنوان منبع اصلی سویه‌های مفید پروبیوتیک در مناطق مختلف استان کرمانشاه (واقع در غرب ایران) تولید و مصرف می‌شوند (Mehrabian et al. 2012).

پروبیوتیک‌های گروه LAB در شرایط مشابه رشد می‌کنند. این باکتری‌ها را نمی‌توان با روش‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی مانند تخمیر قند با دقت بالا شناسایی و متمایز کرد، زیرا این روش‌ها نتایج طبقه‌بندی واضحی را ارائه نمی‌دهند. بنابراین، تکنیک‌های شناسایی مولکولی سریع، دقیق و عملی مانند توالی‌یابی ژن *16S-rRNA* برای شناسایی باکتری‌های جدا شده در سطوح جنس، گونه یا زیرگونه طراحی شده‌اند (Nami, Haghshenas and Khosroushahi. 2018). از سوی دیگر، بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک گروه LAB به شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک صفراوی در دستگاه گوارش حساس

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

هستند و پس از مصرف از بین می‌روند. علاوه‌بر این، پروبیوتیک‌ها می‌توانند حامل ژن‌های بیماری‌زا و ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باشند. بنابراین، مقاومت آنتی‌بیوتیکی با انتقال این ژن‌ها در سایر پروبیوتیک‌ها یا بیماری‌زاها ایجاد می‌شود. از اینرو، این باکتری‌های مفید باید شرایط گوارشی را تحمل کنند، فعالیت‌های ضد بیماری‌زایی مطلوبی از خود نشان دهند، آبگریزی و چسبندگی سلولی قابل قبولی داشته باشند، و همچنین حساسیت بالایی به آنتی‌بیوتیک‌ها نشان دهند تا مزایای ارتقاء سلامت آن‌ها را به حداکثر برسانند (Yang et al. 2017).

بنابراین، این مطالعه با هدف غربالگری آغوز به‌عنوان یکی از محصولات لبنی سنتی مورد استفاده در غرب ایران به منظور تعیین خصوصیات و شناسایی سویه‌های جدید باکتری‌های اسید لاکتیکی با قابلیت پروبیوتیکی بالا و ایمن و با استفاده از سنجش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی (توالی‌یابی ژن *16S-rRNA*) انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، شرایط کشت و جداسازی سویه‌ها

سویه‌های باکتریایی از ۶۰ نمونه آغوز سنتی که به‌طور تصادفی از نقاط مختلف استان کرمانشاه جمع‌آوری شده بود، جداسازی شد. نمونه‌های آغوز به‌صورت مجزا به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، برای جداسازی باکتری‌ها، ۵ میلی‌لیتر از محلول ذکر شده به‌منظور غنی‌سازی و افزایش جمعیت اولیه باکتری‌ها به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) اضافه شد.

سویه‌های باکتریایی از طریق رشد بی‌هوازی در محیط کشت MRS به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تکثیر داده شد و در محیط MRS آگار مشابه شرایط ذکر شده بالا کشت داده شدند. سپس، کلنی‌های باکتریایی توسط آزمایش‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی اولیه از جمله کوکسی یا باسیل بودن سلول، تست کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند (Kiani et al. 2021).

ارزیابی تحمل pH پایین و غلظت بالای نمک صفراوی

برای ارزیابی تحمل باکتری‌ها به pH پایین و نمک صفراوی، ۱۰ میلی‌لیتر از هر کشت باکتریایی که به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت MRS کشت داده شده بود، در ۴۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، مایع‌رویی دور ریخته

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

شد و باقیمانده سلولی بـه مـدت ۳ سـاعت در ۱۰ میلی‌لیتر محلول با pH پایین (۲/۵ =pH در دمـای ۳۷ درجه سلسیوس) و به مـدت ۴ سـاعت در ۱۰ میلی‌لیتر محلول حاوی غلظـت ۰/۳ درصـد نمـک صفراوی (۶/۸ =pH در دمای ۳۷ درجه سلسیوس) با هم‌زدن ملایم دوباره معلق شد.

برای به حداقل رساندن تعداد سویه‌های باکتری مورد بررسی، انتخاب اولیه با اندازه‌گیـری جـذب نـوری (optical density: OD) مطـابق روش توصیف شـده توسـط یانـگ و همکـاران (۲۰۱۶) انجـام شـد. OD سـویه‌های شـاهد و تیمـار شـده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (اپیندورف، آلمـان) در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس، تحمل بـه شرایط اسیدی و نمک صفراوی بـا تعیـین درصـد بقاء باکتری و طبق فرمول ۱ بـرآورد شـد (Nami Haghshenas and Khosroushahi. 2018).

فرمول ۱ درصد بقاء = [OD(بعد از تیمار) / OD(قبل از تیمار)] × ۱۰۰

پس از آن، سویه‌هایی که بهترین نتایج اولیـه را نشان دادند تا ۱۰ بار با استفاده از محلـول نمکـی استریل (کلرید سدیم (۵/۸ گـرم در لیتـر)) رقیـق شدند و ۱۰۰ میکرولیتر از هر محلول رقیق‌شده به مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۳۷ درجـه سلسـیوس بـر روی محـیط کشـت MRS آگـار و بـه‌صـورت هوازی کشت داده شد. سپس، میـزان بقـای سـویه بـاکتری بـا اسـتفاده از فرمـول ۲ محاسـبه شـد.

فرمول ۲ درصد بقاء = (log CFU N1/log CFU N0) × 100

N1 نشان‌دهنده تعداد کل کلنـی‌هـای باکتریـایی بعـد از تیمـار اسـیدی یـا نمـک صـفراوی و N0 نشان‌دهنده تعداد کل کلنی‌های باکتریـایی قبـل از تیمار اسیدی یا نمک صفراوی است (Singh et al. 2009).

بقاء در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی

روش توصیف شده توسط Seiquer و همکـاران (۲۰۱۰) برای ارزیـابی بقـاء باکتری‌هـا در محـیط شـبیه‌سـازی‌شـده شـرایط گوارشـی و در شـرایط آزمایشـگاهی مـورد اسـتفاده قـرار گرفـت. بـرای ارزیابی بقاء در شرایط گوارشی معـده، پپسـین بـا غلظـت نهـایی ۵٪ (w/v) بـه ۹ سـویه باکتریـایی منتخـب (، T7، T3، T20، T18، T34، T29، T39 T46 و T48) بـــا غلظـــت اولیـــه ســـلولی 10^9 CFU/mL × ۳/۶–۱/۹ اضافه شد. سـپس، pH محیط بر روی ۲/۵ تنظیم شد و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با هـم‌زدن ملایـم در ۱۱۰rpm در دقیقه انکوبه شد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

برای ایجاد شرایط گوارشی روده، محلول نمک صفراوی و پانکراتین به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۱ درصد (w/v) اضافه شد. سپس، pH نمونه‌ها بر روی عدد ۶ تنظیم شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت سه ساعت با هم‌زدن ملایم در ۱۱۰rpm در دقیقه انکوبه شدند. قبل و بعد از تمیار در شرایط گوارشی، نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های رقیق‌شده در سه تکرار بر روی محیط MRS آگار کشت داده شدند. سپس، پلیت‌های باکتریایی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند تا تعداد سلول‌های باکتری مشخص شود.

اثرات بازدارنده بر علیه عوامل بیماری‌زا

از روش انتشار در چاهک آگار (agar diffusion well method) برای تعیین فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های جدا شده در برابر برخی عوامل شایع بیماری‌زای انسانی و غذایی مانند *Yersinia enterocolitica* (ATCC 23715)، *Streptococcus mutans* (PTCC 1683)، *Escherichia coli* (PTCC 1276)، *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)، *Bacillus subtilis* (ATCC 19652)، *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932)، *Klebsiella pneumoniae* (PTCC 1053) و *Shigella flexneri* (PTCC 1234) استفاده شد. در این روش غلظت نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ CFU/mL) از هر بیماری‌زا بر روی محیط کشت مولر-هینتون آگار کشت چمنی داده شد و چاهک‌ها بر روی محیط تلقیح داده شده ایجاد شدند. سپس، چاهک‌ها با ۵۰ میکرولیتر مایع رویی فیلتر شده (یک شب کشت داده شده) هر سویه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت یک شب انکوبه شد و در نهایت هاله مهار بیماری‌زا با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد (Nami, Bakhshayesh et al. 2019).

تعیین ماهیت ترکیبات ضد بیماری‌زایی در روشناور هر سویه با روش انجام شده توسط نامی و همکاران (۲۰۱۹) و با برخی تغییرات انجام شد. بر اساس این روش، روشناورهای فاقد سلول سویه‌های باکتری که با سانتریفیوژ کردن به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰rpm و در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌دست آمده بودند، پس از تنظیم pH به ۶/۲، به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئیناز K (ارزیابی ماهیت پروتئینی) و کاتالاز (ارزیابی پراکسید هیدروژن) تیمار شده و سپس فعالیت ضدبیماری‌زایی آن‌ها با روش انتشار در چاهک آگار ارزیابی شد (Nami et al. 2020).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

فعالیت همولیتیک

بررسی فعالیت همولیتیکی سویه‌های پروبیوتیک بر اساس روش نامی و همکاران (۲۰۱۹c) ارزیابی شد. بر طبق این روش، سه طبقه‌بندی برای ارزیابی فعالیت همولیتیکی مورد استفاده قرار گرفت: هاله روشن در اطراف کلنی، همولیز بتا؛ هاله سبز رنگ در اطراف کلنی، همولیز آلفا و عدم هاله در اطراف کلنی، همولیز گاما (Nami, Vaseghi Bakhshayesh et al. 2019).

آبگریزی سطح سلول

آبگریزی سطح سلولی توسط روش انجام شده توسط نامی و همکاران بررسی شد. در این روش کشت شبانه سویه‌های باکتری در ۱۰۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و باکتری‌های ته نشین شده (10^8 CFU/mL) در ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (PBS) معلق شد و جذب اولیه در ۶۰۰ نانومتر (A0) اندازه‌گیری شد. سپس، سوسپانسیون باکتریایی با یک میلی‌لیتر زایلن (xylene) (مرک، آلمان) با ورتکس کردن به مدت ۲ دقیقه تیمار شد.

فازهای ایجاد شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ ساعت جدا گشته و جذب فاز آبی اندازه‌گیری شد (A1). این آزمایش در سه تکرار انجام شد و آبگریزی سطح سلول به‌صورت درصد و از طریق فرمول $(1- A_1/A_0) \times 100$ تعیین شد (Nami, Haghshenas, Bakhshayesh et al. 2018).

چسبندگی سلولی در شرایط برون‌تنی

توانایی چسبندگی سویه‌ها به سلول‌های اپیتلیال انسان در رده سلولی Caco-2 تعیین شد. برای انجام این آزمون سلول‌های Caco-2 در شرایط کنترل‌شده شامل ۵٪ CO_2 در ۳۷ درجه سلسیوس و در محیط RPMI-1640 (سیگما) غنی‌شده با ۱۰٪ سرم جنین گاوی غیرفعال‌شده با حرارت و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین-استرپتومایسین رشد داده شدند. برای سنجش چسبندگی باکتری‌ها، سلولهای Caco-2 بر روی ورقه‌های شیشه‌ای که در پلیت‌های کشت بافت ۶ چاهکی قرار گرفته بودند، کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (۵٪ CO_2)، تک لایه‌ها دو بار با PBS استریل (pH= ۷/۴) شستشو شده و ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی (1×10^7 CFU/mL) به هر پلیت اضافه شد. پلیت‌های سلولی تلقیح‌شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت انکوبه شده و سپس ۳ بار با بافر PBS (pH= ۷/۴)

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

شستشو داده شد تا باکتری‌های غیرچسبنده حذف شوند.

باکتری‌های چسبنده با استفاده از محلول تریپسین-EDTA (۰/۵٪) جدا شده و در ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی دوباره معلق شدند. سپس، رقت‌های سریالی از باکتری‌ها بر روی MRS آگار کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه شد. درصد چسبندگی با تعیین و مقایسه تعداد سلول‌های باکتری چسبیده به کل سلول‌های باکتریایی اندازه‌گیری شد. آزمون چسبندگی سلولی در سه تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین و انحراف استاندارد (SD) بیان شد (Noori et al. 2013).

جذب کلسترول

توانایی کاهش کلسترول سویه‌ها با استفاده از روش o-phthaldehyde که توسط میرعمادی و همکاران شرح داده شده بود، اندازه‌گیری شد. سویه‌ها در محیط کشت MRS غنی‌شده با کلسترول محلول در آب (poly oxy ethanyl cholesteryl sebacate; Sigma) با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۰/۳ درصد نمک صفرای (bile oxgall) تلقیح و ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. سپس، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۴۳۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه برداشت شد و کلسترول باقی‌مانده در فاز آبی به روش o-phthaldehyde اندازه‌گیری شد (Miremadi et al. 2014).

قابلیت تجمع خودکار و مشترک

توانایی تجمع خودکار سویه‌ها با روش Angmo و همکاران اندازه‌گیری شد. برای تعیین درصد تجمع خودکار از فرمول ۳ استفاده شد (Angmo et al. 2016).

فرمول ۳ درصد تجمع خودکار = $1 - (At/A0) \times 100$

تجمع مشترک سویه‌ها با چهار بیماری‌زا بر اساس روش Zuo و همکاران انجام شد و درصد تجمع مشترک بر اساس فرمول ۴ تعیین شد.

فرمول ۴ درصد تجمع مشترک = $(A0 - At)/ At \times 100$

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

در معادله‌های ذکرشده A0 نشان‌دهنده جذب در زمان صفر و At نشان‌دهنده جذب در زمان t است (Zuo et al. 2016).

حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

برای تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های پروبیوتیک، روش انتشار دیسک در آگار بر روی تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های پرمصرف و مهم از نظر بالینی مانند سفیکسیم (۵ میکروگرم)، آزیترومایسین (۱۵ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، تری‌متوپریم سولفامتوکسازول (۱/۲۵-۲۳/۷۵ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفالکسین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک اسید (۱۰/۲۰ میکروگرم) و ونکومایسین (۳۰ میکروگرم) مورد استفاده قرار گرفت. واحد مورد استفاده مقدار پودر آنتی‌بیوتیک لود شده بر روی دیسک است که به‌صورت میکروگرم بر دیسک بیان شده است. در این روش پس از کشت یک شبه سویه‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS agar (دمای ۳۷ درجه سلسیوس) و قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی خریداری شده از شرکت پادتن طب، بر روی محیط‌های تلقیح‌شده، قطر هاله‌های مهاری اطراف دیسک‌ها با کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد (Abushelaibi et al. 2017).

ژن‌های بیماری‌زا

تکنیک مولتی‌پلکس PCR برای تشخیص ژن‌های بیماری‌زای بالقوه در سویه‌های پروبیوتیک به‌کار گرفته شد. در این مطالعه ۱۰ ژن بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت (*esp, ace, ccf, gel E, cylA, cylM, cylB, agg, cpd, cob*). همچنین *Enterococcus faecium* (ATCC 8043) و *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) به‌عنوان کنترل استفاده شد.

مولتی‌پلکس PCR در این مطالعه بر اساس برنامه ذکر شده انجام شد: دناتوره‌شدن اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و پس از آن ۳۵ چرخه شامل دناتوره‌شدن (۹۵ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه)، اتصال (۵۴ و ۵۶ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه)، طویل‌سازی (۷۲ درجه سلسیوس برای ۶۰ ثانیه) و طویل‌سازی نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه. سپس محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد مورد بررسی قرار گرفت (Kouhi et al. 2021).

شناسایی مولکولی

برای استخراج دی.ان.ای ژنومی باکتریایی از روش نامی و همکاران (۲۰۱۸) استفاده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

شـــــــــــد. آغازگرهـــــــــــای Hal-6F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و Hal-R6 (5′-TACCTTGTTAGGACTTCACC-3′) بـرای تکثیـر ژن *16S-rRNA* باکتریـایی مـورد استفاده قرار گرفتند. چرخه‌های برنامه PCR برای تکثیـر دی.ان.ای ژنـومی بـه شـرح زیـر بـود: دناتوره‌شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۲ چرخه شامل: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجـه سلسـیوس به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۵ ثانیه و تکثیـر نهـایی در ۷۲ درجـه سلسـیوس بـه مدت ۵ دقیقه.

دی.ان.ای ژنومی پس از تکثیر و خالص‌سـازی، توسـط شـرکت Macrogene کـره جنـوبی تعیـین توالی شد. سپس نتایج تعیین توالی با تـوالی‌هـای ذخیـره شـده در سـایت NCBI و GeneBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مورد بررســی و مقایســه قــرار گرفتنــد (Nami, Haghshenas and Khosroushahi. 2018).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایشات بـر اسـاس طـرح بـه‌طور کامـل تصادفی با سـه تکـرار بـرای هـر گـروه آزمایشـی طراحی شد. از نرم‌افزار SPSS statistics19 بـرای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. سپس داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و دانکن مـورد تجزیه و تحلیـل قـرار گرفتنـد. همچنـین تفـاوت معنی‌داری در سطح $P<۰/۰۵$ برای میانگین داده‌ها در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

شناسایی فنوتیپیکی باکتری‌ها

کلنـی‌هـای باکتریـایی سـفید تـا کرمـی رنـگ و نیمکره‌ای شکل جداسازی شدند. از بین کلنی‌های موجود، در مجموع ۳۶ باکتری میلـه‌ای یـا کـروی شکل که کاتالاز منفـی و گـرم مثبـت بودنـد و در محیط کشت اختصاصی لاکتیـک اسـید باکتری‌هـا (MRS) و در شرایط بی‌هوازی رشد کرده بودنـد، بـه‌عنوان باکتری‌هـای LAB جـدا شـدند و بـرای تجزیه و تحلیل بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند.

تحمل pH پایین و غلظت بالای نمک صفراوی

بررسی OD در pH=۲/۵ بـه مـدت ۳ سـاعت و غلظـت ۰/۳ درصـد نمـک صـفراوی بـه مـدت ۴ ساعت به‌عنوان ارزیابی ابتـدایی بـرای غربـالگری اولیه ۳۶ سویه LAB مورد استفاده قرار گرفت. بـا توجه به نتایج نشان داده شده در جدول ۱، برخی از سویه‌های مورد آزمایش در محیط‌های اسیدی و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

نمک صفراوی به خوبی زنده ماندند. از سوی دیگر، تفاوت زیادی در بقاء سویه‌ها در شرایط اسیدی و نمکی وجود داشت.

با توجه به نتایج اولیه مبتنی بر آزمایش جذب نوری، ۹ سویه‌ی A2، A6، A11، A14، A18، A21، A23، A27 و A28 دارای نرخ زنده‌مانی بیش از ۷۲ درصد بودند و بنابراین برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شدند. تعداد باکتری‌ها بر اساس Log CFU/mL برای سویه‌های منتخب پس از ۳ ساعت انکوباسیون در pH=۲/۵ و ۴ ساعت انکوباسیون در نمک صفراوی ۰/۳٪ در جدول ۲ نشان داده شده است. پس از ۱ ساعت انکوباسیون در شرایط مذکور، کاهش جزئی در Log CFU (≤۰/۶۰۶) مشاهده شد و تمامی سویه‌ها میزان زنده‌مانی بالایی را در اولین ساعت انکوباسیون نشان دادند. از ساعت ۱ تا ۲، کاهش بیشتری در Log CFU (۰/۰۴۶ – ۳/۰۰۹) مشاهده شد. هم چنین در این مدت، سویه‌های متحمل مقاومت بالاتری نسبت به سویه‌های حساس نشان دادند. بین ساعت ۲ تا ۳، هر ۹ سویه کاهش کمی در Log CFU (≥۰/۶۰۴) نشان دادند. در نهایت، از ساعت ۳ تا ۴ در شرایط نمک صفراوی، کاهش بسیار کمی در Log CFU (۰/۲۸۶–۰/۰۱۷) در بین سویه‌ها مشاهده شد.

جدول ۱- منشأ لبنی، رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و میزان بقاء سویه‌های جدا شده در pH=۲/۵ و نمک صفراوی ۰/۳٪.

میزان بقا (%) = [(OD600 (بعد از تیمار)/OD600 (قبل از تیمار)×100]

باکتری	منشأ باکتری	رنگ آمیزی گرم	تست کاتالاز	میزان بقا (٪) در pH=۲/۵	میزان بقا (٪) در نمک صفراوی ۰/۳٪
A1	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۳۱/۵۸ ± ۰/۹۸ ^{fghi}	۵۲/۲۱ ± ۲/۰۹ ^{mn}
A3	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۸۰/۶۰ ± ۱/۰۲ ^{qr}	۹۸/۵۰ ± ۰/۴۵ ^{s}
A4a	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۵۲/۲۲ ± ۱/۰۴ ^{mn}	۵۸/۶۹ ± ۱/۷۳ ^{p}
A4b	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۱۸/۶۲ ± ۰/۵۷ ^{b}	۳۲/۰۷ ± ۲/۱۱ ^{g}
A6	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۲۹/۳۸ ± ۱/۰۵ ^{efgh}	۳۸/۹۳ ± ۰/۸۴ ^{gh}
A7	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۸۸/۶۷ ± ۰/۹۴ ^{As}	۱۰۸/۱۱ ± ۰/۹۶ ^{a}
A9	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۲۸/۲۲ ± ۱/۰۳ ^{defg}	۴۰/۶۱ ± ۱/۲۱ ^{hi}
A12	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۴۳/۰۷ ± ۰/۵۴ ^{k}	۴۹/۱۳ ± ۱/۶۷ ^{l}
A13	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۳۷/۹۳ ± ۱/۰۸ ^{j}	۴۴/۸۵ ± ۱/۸۳ ^{jk}
A16	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۱۲/۵۳ ± ۰/۸۴ ^{a}	۲۱/۶۱ ± ۱/۹۲ ^{b}
A18	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۹۴/۸۱ ± ۱/۲۳ ^{uv}	۱۰۹/۹۳ ± ۱/۳۴ ^{w}
A19a	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۸/۰۸ ± ۱/۱۴ ^{a}	۱۶/۰۹ ± ۱/۱۴ ^{a}
A19b	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۵۵/۲۴ ± ۰/۹۴ ^{no}	۵۸/۷۵ ± ۱/۴۷ ^{pq}
A20	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۸۴/۷۶ ± ۰/۹۷ ^{rs}	۱۱۲/۳۱ ± ۱/۶۵ ^{x}
A23	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۴۴/۵۳ ± ۱/۸۶ ^{kl}	۵۰/۲۳ ± ۱/۷۲ ^{lm}
A25	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۹۵,۳۲ ± ۱/۱۲ ^{ghij}	۴۲/۷۱ ± ۱/۶۵ ^{ij}
A26	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۵۲/۱۷ ± ۰/۹۷ ^{mn}	۵۷/۹۶ ± ۰/۷۴ ^{op}

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

A29	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۷۹/۵۹ ± ۰/۹۳ ^{qr}	۹۴/۸۳ ± ۰/۹۵ ^{r}
A30	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۶۰/۶۶ ± ۰/۸۳ ^{p}	۶۱/۲۷ ± ۰/۷۲ ^{pq}
A33	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۳۳/۹۱ ± ۰/۷۸ ^{hij}	۳۶/۹۹ ± ۱/۳۱ ^{g}
A34	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۹۸/۹۱ ± ۰/۸۲ ^{v}	۱۲۳/۱۱ ± ۱/۵۸ ^{y}
A37	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۹/۶۶ ± ۱/۰۴ ^{a}	۱۹/۷۴ ± ۲/۰۱ ^{b}
A39	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۷۷/۱۲ ± ۱/۴۴ ^{q}	۷۲ ± ۲/۱۳ ^{q}
A42	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۱۸/۴۴ ± ۱/۱۱ ^{b}	۳۰/۹۷ ± ۱/۸۲ ^{ef}
A43a	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۲۵/۰۲ ± ۱/۰۳ ^{cde}	۲۷/۲۳ ± ۱/۷۴ ^{cd}
A43b	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۵۹/۹۱ ± ۱/۲۳ ^{op}	۶۱/۳۸ ± ۰/۶۴ ^{q}
A46	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۹۰/۴۱ ± ۱/۱۶ ^{Au}	۱۰۳/۲۴ ± ۲/۰۴ ^{u}
A48	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۷۹/۲۵ ± ۰/۹۲ ^{q}	۱۰۷/۲۱ ± ۱/۵۶ ^{v}
A51	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۵۲/۸ ± ۱/۲۹ ^{mn}	۵۶/۱۲ ± ۱/۶۷ ^{o}
A52	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۴۹/۰۱ ± ۱/۲۸ ^{lm}	۵۴/۵۳ ± ۱/۶۴ ^{n}
A54	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۲۰/۱۴ ± ۱/۱۰ ^{bc}	۲۲/۱۵ ± ۰/۷۷ ^{b}
A55	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۲۶/۳۵ ± ۱/۴۴ ^{def}	۳۲/۱۰ ± ۱/۶۳ ^{f}
A58	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۴۲/۶۹ ± ۱/۱۷ ^{mn}	۴۵/۹۳ ± ۱/۵۱ ^{k}
A60a	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۱۸/۱۹ ± ۱/۲۱ ^{b}	۲۵/۵۰ ± ۱/۶۴ ^{c}
A60b	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۳۶/۷۲ ± ۱/۳۵ ^{ij}	۳۹/۶۵ ± ۱/۲۳ ^{gh}
A60c	آغوز	گرم مثبت	کاتالاز منفی	۲۳/۳۸ ± ۱/۷۵ ^{bcd}	۲۹/۰۹ ± ۱/۱۴ ^{de}

a – y: میانگین نتایج با حرف یکسان برای هر سویه جدا شده در سطح $P<0.05$ تفاوت معنی‌داری ندارند. مقادیر نشان داده شده میانگین ± انحراف استاندارد (n= 3) است.

جدول ۲- نتایج غربالگری مجدد و درصد بقاء سویه‌های منتخب جدا شده پس از ۳ ساعت انکوباسیون در pH= ۲/۵ و ۴ ساعت (h) انکوباسیون در نمک صفراوی ۰/۳٪ و شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی

نام سویه	شمارش نهایی (Log CFU/mL) پس از ۳ ساعت تیمار در pH= ۲/۵					شمارش نهایی (Log CFU/mL) پس از ۴ ساعت (h) تیمار با نمک صفراوی ۰/۳٪					بقاء در شرایط گوارشی معده	بقاء در شرایط گوارشی روده
	۰ (h)	۱(h)	۲(h)	۳ (h)	٪ بقاء	۰ (h)	۱(h)	۲(h)	۳ (h)	۴ (h)	٪ بقاء	٪ بقاء	٪ بقاء
A2	۹/۸۴۳	۹/۵۱۸	۷/۵۹۳	۷/۲۱۲	۷۳	۹/۸۴۳	۹/۴۹۳	۸/۷۱۸	۸/۳۴۲	۸/۰۸۹	۸۲	۳۹	۶۶
A6	۹/۵۲۷	۹/۲۹۴	۸/۱۱۱	۷/۹۲۴	۸۳	۹/۳۲۸	۹/۲۳۶	۸/۸۲۱	۸/۷۴۴	۸/۶۸۹	۹۳	۳۲	۷۴
A11	۹/۲۴۶	۹/۱۱۹	۸/۷۸۴	۸/۵۴۰	۹۲	۹/۲۴۶	۹/۲۳۳	۹/۱۸۷	۹/۱۷۱	۹/۱۵۴	۹۹	۷۳	۸۵
A14	۹/۶۹۳	۹/۲۳۹	۷/۴۲۴	۷/۲۹۵	۷۵	۹/۶۹۳	۹/۳۴۱	۸/۸۶۴	۸/۷۱۸	۸/۶۷۹	۸۹	۴۱	۶۳
A18	۹/۱۵۱	۸/۵۸۹	۷/۰۸۱	۶/۵۲۶	۷۱	۹/۱۵۱	۸/۹۲۴	۷/۷۱۵	۷/۵۹۷	۷/۳۴۱	۸۰	۳۴	۶۱
A21	۹/۳۲۸	۸/۸۹۴	۸/۲۱۸	۸/۰۳۶	۸۶	۹/۶۳۲	۹/۶۱۸	۹/۴۲۷	۹/۳۹۱	۹/۳۴۶	۹۷	۶۸	۸۴
A23	۹/۷۱۴	۹/۱۰۸	۷/۳۳۲	۷/۰۲۲	۷۲	۹/۷۱۴	۹/۵۲۴	۸/۲۹۷	۷/۶۹۳	۷/۴۰۷	۷۶	۴۳	۵۸
A27	۹/۹۱۹	۹/۵۰۳	۸/۲۴۲	۸/۰۵۳	۸۱	۹/۹۱۹	۹/۸۲۴	۹/۴۸۱	۹/۲۷۹	۹/۰۳۵	۹۱	۶۲	۷۱
A28	۹/۶۳۲	۹/۳۲۷	۶/۳۱۸	۵/۹۱۴	۶۱	۹/۵۲۷	۹/۳۱۱	۸/۸۴۳	۸/۶۱۸	۸/۴۹۰	۸۹	۵۹	۶۸

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

اثرات بازدارنده بر علیه عوامل بیماری‌زا

سویه‌های A6، A2، A18، A21، A11، A14، A23، A27 و A28 که تحمل قابل قبولی در pH پایین، نمک صفراوی بالا و شرایط گوارشی داشتند، برای ارزیابی اثرات مهاری بر روی عوامل بیماری‌زا انتخاب شدند. فعالیت‌های آنتاگونیستی ۹ سویه جدا شده در برابر ۸ عامل بیماری‌زا در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که شش سویه شامل A11، A14، A18، A21، A23 و A28 فعالیت ضد بیماری‌زایی قابل‌توجهی نشان دادند و توانستند رشد همه عوامل بیماری‌زا را مهار کنند. همچنین، سویه‌های A6 و A27 فعالیت آنتاگونیستی متوسطی نشان دادند و هر کدام از آن‌ها از رشد سه عامل بیماری‌زا از جمله *Y. enterocolitica*، *S. mutans*، *S. aureus* و *K. pneumoniae* جلوگیری کردند. از سوی دیگر، سویه A2 فعالیت آنتاگونیستی ضعیفی نشان داد و فقط فعالیت بازدارندگی بر روی رشد *S. mutans* نشان داد (جدول ۳). پس از تنظیم pH روشناورهای باکتریایی به ۶/۲، سویه‌های A6، A2، A27 و A28 هیچ خاصیت ضد بیماری‌زایی نشان ندادند. همچنین سویه‌های A11، A14، A18، A21 و A23 قادر به جلوگیری از رشد *L. monocytogenes*، *S. flexneri*، *B. subtilis* و *K. pneumoniae* نبودند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که مکانیسم مهار این سویه‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای مذکور به دلیل تولید اسید است. از سوی دیگر، پس از تیمار روشناور سویه‌های A11، A14، A18، A21 و A23 با آنزیم کاتالاز و انجام آزمایشات ضد بیماری‌زایی علیه *E. coli*، *S. mutans*، *Y. enterocolitica* و *S. aureus*، سویه‌های A14 و A23 در برابر *Y. enterocolitica* و *E. coli* و سویه‌های A11، A18 و A21 در برابر *S. aureus* فعالیت ضد بیماری‌زایی نشان دادند. بنابراین، نتیجه گرفته شد که ماهیت بازدارندگی این سویه‌ها در برابر بقیه عوامل بیماری‌زا به دلیل تولید پراکسید هیدروژن است. در نهایت، روشناورهای باکتریایی با آنزیم پروتئاز K تیمار شده و خواص ضد بیماری‌زایی سویه‌های A11، A14، A18، A21 و A23 در برابر *E. coli*، *Y. enterocolitica* و *S. aureus* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج، هیچ هاله مهاری مشاهده نشد که نشان‌دهنده‌ی ماهیت پروتئینی (باکتریوسینی) روشناور این سویه‌ها در مقابل عوامل بیماری‌زای ذکر شده است.

بقاء در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی

در مجموع ۹ سویه باکتری انتخاب شده (مقاوم ترین سویه‌ها در شرایط pH پایین و غلظت بالای

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

نمک‌های صفراوی) از طریق آزمایش مقاومت در شرایط هضم گوارشی مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. هر ۹ سویه باکتری پس از قرار گرفتن در معرض شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی به‌طور مؤثری زنده ماندند (جدول ۲). بر اساس نتایج نشان داده شده در جدول ۲، سویه‌های منتخب درصد بقاء بیشتری در شرایط گوارشی روده نسبت به شرایط گوارشی معده داشتند (۴۲٪–۹٪). همچنین بیشترین قابلیت بقاء در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی متعلق به دو سویه A11 و A21 به‌ترتیب با ارزش بقاء ۷۳٪ و ۶۸٪ در شرایط گوارشی معده و ۸۵٪ و ۸۴٪ در شرایط گوارشی روده بود.

جدول ۳- اثر مهاری سویه‌های باکتری LAB جدا شده در مقابل عوامل بیماری‌زا.

بیماری‌زا/سویه	قطر هاله بازدارندگی (mm)								
	A2	A6	A11	A14	A18	A21	A23	A27	A28
Y. enterocolitica	۰±۰^{a}	۹/۸±۰/۷^{b}	۱۲/۴±۰/۴^{c}	۱۳/۷±۰/۶^{d}	۹/۱±۰/۶^{b}	۱۳/۴±۰/۸^{cd}	۸/۵±۰/۷^{b}	۹/۶±۰/۹^{b}	۱۱/۹±۰/۸^{c}
S. mutans	۶/۳۰±۰/۴^{a}	۵/۹±۰/۱^{a}	۱۲/۲±۰/۸^{d}	۱۰/۹±۰/۷^{c}	۹/۲±۰/۴^{b}	۱۰/۵±۰/۲^{cd}	۱۰/۹±۰/۷^{c}	۵/۶±۰/۴^{a}	۱۱/۷±۰/۳^{cd}
E. coli	۰±۰^{a}	۰±۰^{a}	۱۲/۳±۱/۰^{cd}	۱۷/۴±۰/۶^{f}	۸/۹±۰/۷^{bc}	۱۳/۲±۰/۸^{e}	۹/۳±۰/۷^{b}	۰±۰^{a}	۱۰/۹±۰/۳^{d}
S. aureus	۰±۰^{a}	۶/۳±۰/۶^{b}	۱۲/۴±۰/۷^{d}	۱۰/۵±۰/۷^{cd}	۹/۹±۰/۸^{c}	۱۲/۶±۰/۷^{cd}	۱۱/۹±۰/۸^{d}	۰±۰^{a}	۱۱/۴±۰/۳^{d}
B. subtilis	۰±۰^{a}	۰±۰^{a}	۱۲/۸±۰/۵^{d}	۱۳/۴±۰/۷^{d}	۱۰/۶±۰/۸^{c}	۱۲/۱±۱/۱^{d}	۹/۷±۰/۴^{b}	۰±۰^{a}	۹/۸±۰/۸^{b}
L. monocytogenes	۰±۰^{a}	۰±۰^{a}	۱۲/۹±۱/۰^{d}	۱۳/۱±۰/۴^{d}	۱۱/۷±۰/۵^{c}	۱۲/۹±۰/۲^{d}	۹/۱±۰/۸^{b}	۰±۰^{a}	۱۲/۵±۱/۰^{d}
K. pneumoniae	۰±۰^{a}	۰±۰^{a}	۱۲/۱±۰/۴^{c}	۸/۹±۰/۸^{b}	۸/۳±۰/۹^{b}	۹/۹±۱/۰^{b}	۸/۸±۱/۶^{b}	۹/۷±۰/۴^{b}	۱۲/۶±۰/۴^{c}
S. flexneri	۰±۰^{a}	۰±۰^{a}	۱۴/۱±۰/۴^{e}	۱۱/۹±۰/۹^{d}	۸/۱±۰/۵^{b}	۱۲/۶±۰/۶^{de}	۸/۴±۰/۵^{b}	۰±۰^{a}	۱۰/۸±۰/۶^{c}

a – e: میانگین نتایج با حرف یکسان برای هر سویه جدا شده در سطح $P<0.05$ تفاوت معنی‌داری ندارند.

تجزیه و تحلیل آماری هر فرمول جداگانه انجام شد. مقادیر نشان داده شده میانگین ± انحراف استاندارد (n= 3) است.

معیار قدرت بازدارندگی: قوی= r≥20 mm، متوسط= r<20 mm و r>10 mm، ضعیف= r≤ 10 mm.

فعالیت همولیتیک

سویه‌های باکتریایی ارزیابی شده هاله واضحی بر روی محیط کشت آگار خونی ایجاد نکردند که نشان دهده این است که سویه‌ها فعالیت همولیتیک بتا ندارند. همچنین سویه‌های A11، A14، A18، A21، A23 و A28 هیچ فعالیت همولیتیکی نشان ندادند (گاما همولیتیک هستند)، در حالی‌که سویه‌های A2، A6 و A27 هاله‌های سبز رنگی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

نشان دادند که معرف فعالیت همولیتیک آلفا است. بنابراین، این سه سویه از تجزیه و تحلیل بیشتر کنار گذاشته شدند (جدول ۴).

آبگریزی سطح سلول

بر اساس نتایج، ۶ سویه باکتری A11، A14، A18، A21، A23، و A28، توانایی آبگریزی سطح سلولی بالاتر از ۴۴٪ نشان دادند. از سوی دیگر سویه A11 و A21 آبگریزی سطح سلولی به‌میزان ۶۲±۰/۸۷ و ۶۸±۱/۴۲ داشتند که به‌طور معنی داری ($P\leq0.05$) بیشتر از سایر سویه‌های مورد آزمایش بود (جدول ۴).

جدول ۴- نتایج فعالیت همولیتیک، آبگریزی سطح سلول (٪)، چسبندگی سلولی، جذب کلسترول (٪)، تجمع خودکار (٪)، و تجمع مشترک (٪) سویه‌های باکتری LAB جدا شده.

سویه باکتری	فعالیت همولیتیک	آبگریزی سطح سلول (٪)	چسبندگی سلولی	جذب کلسترول (٪)	تجمع خودکار (٪)	تجمع مشترک (٪)			
						E. coli	*L. monocytogenes*	*Y. enterocolitica*	*B. subtilis*
A2	α	-	-	-	-	۳/۹۷±۰/۵۴ ^{e}	۷/۸۷±۰/۷۳ ^{g}	۳/۴۳ ± ۰/۶۷ ^{i}	۲/۹۳ ± ۰/۵۳ ^{g}
A6	α	-	-	-	-	۳/۸۶±۰/۷۵ ^{e}	۳/۱۱±۰/۸۹ ^{h}	۳/۹۴ ± ۰/۷۶ ^{h}	۲/۷۴ ± ۰/۲۳ ^{g}
A11	γ	۶۲±/۸۷	قوی	۷۸±۱/۳۲	۷۸±۱/۴۲	۲۲/۳۸±۱/۰۹ ^{a}	۲۱/۱۲ ± ۱/۰۵ ^{a}	۲۲/۰۶ ± ۱/۳۴ ^{b}	۱۶/۲۶ ± ۱/۱۴ ^{a}
A14	γ	۵۵±۰/۹۸	ضعیف	۳۳±۱/۷۲	۶۳±۱/۵۶	۱۰/۳۴±۰/۵۶ ^{b}	۷/۳۳ ± ۰/۸۱ ^{de}	۱۱/۵۵ ± ۰/۹۱ ^{d}	۸/۱۲ ± ۰/۷۶ ^{c}
A18	γ	۵۲±۱/۲۳	ضعیف	۳۲±۱/۵۴	۵۱±۱/۲۴	۸/۲۶±۱/۵۴ ^{c}	۶/۸۴ ± ۰/۷۷ ^{e}	۸/۳۲ ± ۰/۹۹ ^{e}	۶/۸۵ ± ۰/۹۷ ^{d}
A21	γ	۶۸±۱/۴۲	ضعیف	۳۳±۱/۷۱	۸۳±۱/۳۶	۲۱/۹۴±۱/۱۳ ^{a}	۱۶/۲۵ ± ۱/۰۵ ^{b}	۲۵/۵۱ ± ۱/۲ ^{a}	۱۷/۱۷ ± ۱/۱۲ ^{a}
A23	γ	۴۴±۱/۱۴	ضعیف	۲۴±۱/۵۳	۴۲±۱/۷۱	۵/۲۳±۰/۵۶ ^{d}	۴/۹۵ ± ۰/۹۴ ^{f}	۵/۳۸ ± ۰/۷۳ ^{f}	۴/۸۹ ± ۰/۷۹ ^{e}
A27	α	-	-	-	-	۲/۶۴±۰/۶۵ ^{f}	۲/۹۶ ± ۰/۷۶ ^{h}	۴/۱۹ ± ۰/۸۴ ^{gh}	۳/۷۸ ± ۰/۹۵ ^{f}
A28	γ	۴۸±۱/۴۲	ضعیف	۹±۱/۶۲	۳۸±۱/۱۹	۱۰/۹±۱/۲۳ ^{b}	۸/۳۷ ± ۱/۲۳ ^{c}	۱۵/۱۳ ± ۱/۲۴ ^{c}	۸/۹۳ ± ۱/۰۰ ^{bc}

y – a: میانگین نتایج با حرف یکسان برای هر سویه جدا شده درسطح $P<0.05$ تفاوت معناداری ندارند. تجزیه و تحلیل آماری هر فرمول جداگانه انجام شد. مقادیر نشان داده شده میانگین ± انحراف استاندارد (n= 3) است.

چسبندگی سلولی در شرایط برون‌تنی

در این مطالعه مشاهده شد که سویه‌های A11 (۶۲±۲/۴٪) و A21 (۷۲±۰/۸٪) قوی‌ترین چسبندگی را به سلول‌های Caco-2 روده انسان نشان می‌دهند. همچنین چهار سویه باکتری A14 (۴۲±۱/۷٪)، A18 (۵۱±۲/۶٪)، A23 (۴۷±۲/۲٪) و A28 (۲۸±۰/۸٪) چسبندگی ضعیفی داشتند (جدول ۴).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

جذب کلسترول

کارآیی حذف کلسترول توسط سویه‌ها از محیط کشت (جذب کلسترول) در جدول ۴ ارائه شده است. سویه A11، ۷۸ درصد کلسترول (۱۱۷ از ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را پس از ۲۰ ساعت انکوباسیون جذب کرد، در حالی‌که سویه‌های A21، A23، A14، A18 و A28 به‌ترتیب ۳۳، ۲۴، ۳۳، ۳۲ و ۹ درصد از کلسترول محیطی را جذب کردند.

قابلیت تجمع خودکار و مشترک

نتایج قابلیت تجمع خودکار سلول‌های باکتری در جدول ۴ نشان داده شده است. نرخ تجمع خودکار سویه‌ها از ۱/۱۹±۳۸ تا ۱/۳۶±۸۳ متغیر بود. بالاترین تجمع خودکار برای سویه‌های A21 و A11 با نرخ ۸۳٪ و ۷۸٪ به دست آمد. علاوه‌بر این، سویه‌های A18، A14، A23 و A28 کمترین میزان تجمع خودکار سلولی با نرخ کمتر از ۶۴٪ را نشان دادند. نتایج تجمع مشترک سویه‌ها در حضور *E. coli*، *L. monocytogenes*، *Y. enterocolitica* و *B. subtilis* به‌طور جداگانه در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که سویه‌های A21 و A11 بهترین قابلیت تجمع مشترک را دارند. قابلیت تجمع مشترک سویه‌های A21 و A11 با هر چهار عامل بیماری زا در مقایسه با سایر سویه‌ها به‌طور معنی‌داری ($P\geq /۰۵$) بیشتر بود.

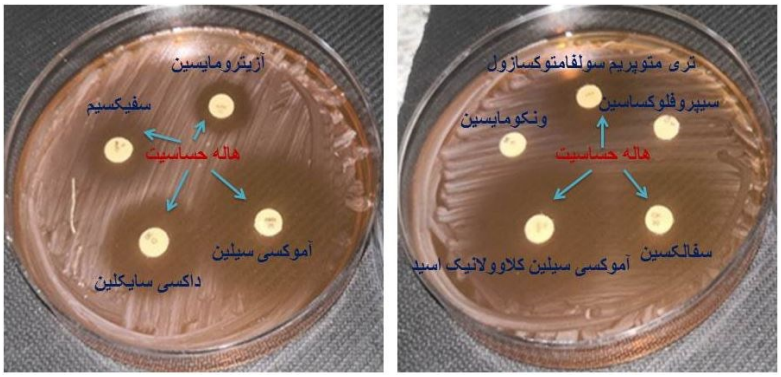
بررسی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

بر اساس نتایج قبلی، سویه‌های A11، A14، A18، A21، A23 و A28 تحمل بالایی در pH پایین، نمک صفراوی بالا و شرایط گوارشی داشتند و همچنین فعالیت ضد بیماری‌زایی قابل قبولی از خود نشان دادند. بنابراین، این ۶ سویه برای ارزیابی حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها انتخاب شدند (شکل ۱).

نتایج حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها در برابر ۹ آنتی‌بیوتیک مهم بالینی و پرکاربرد در ایران در جدول ۵ ارائه شده است. بر اساس نتایج، هر شش سویه نسبت به سفیکسیم، آزیترومایسین، آموکسی‌سیلین، داکسی‌سایکلین، سفالکسین و آموکسی‌سیلین کلاوولانیک اسید حساس یا نیمه‌حساس بودند. همچنین، فقط سویه‌های A14 و A21 نسبت به تری‌متوپریمسولفامتوکسازول نیمه حساس بوده و بقیه سویه‌ها نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. از سوی دیگر، همه سویه‌ها نسبت به سیپروفلوکساسین و ونکومایسین مقاوم بودند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]



شکل ۱- حساسیت و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه A18 با تشکیل هاله حساسیت.

جدول ۵- پروفایل حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های LAB جدا شده.

سویه باکتری	(mm) قطر هاله حساسیت به آنتی‌بیوتیک								
	V	AMC	CN	CP	SXT	D	AMX	AZM	CFM
A11	۰ R	۳۹S	۳۲ S	۰ R	۲۵R	۲۱ S	۳۵S	۱۴I	۲۲S
A14	۰ R	۳۱S	۲۴ S	۰ R	۲۶I	۲۶S	۲۹S	۱۵I	۲۲S
A18	۰ R	۳۸S	۳۵S	۰ R	۲۳R	۲۱ S	۳۰S	۱۶I	۱۶I
A21	۰ R	۲۹S	۲۱ S	۰ R	۲۸I	۲۸S	۲۸S	۱۴I	۱۸I
A23	۰ R	۳۷S	۳۵S	۰ R	۲۵R	۲۵S	۳۲S	۱۹S	۲۴ S
A28	۰ R	۳۲S	۲۵S	۰ R	۲۰R	۲۶S	۳۰S	۲۰S	۲۸S

اسامی مخفف آنتی‌بیوتیک‌ها: CFM, cefixime; AZM, azithromycin; AMX, amoxicillin; D, doxycycline; SXT, trimethoprim sulfamethoxazole; CP, ciprofloxacin; CN, cephalexin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; V, vancomycin.

معیار حساسیت و مقاومت برای هر آنتی بیوتیک: حساس =S، متوسط =I، مقاوم =R.

نتایج سفکسیم بر اساس: R ≤15 mm; I: 16–18 mm; S≥19 mm

نتایج آزیترومایسین بر اساس: R ≤13 mm; I: 14–17 mm; S≥18 mm

نتایج آموکسی‌سیلین بر اساس: R ≤18 mm; I: 19–21 mm; S≥22 mm

نتایج دوکسی‌سیکلین بر اساس: R ≤10 mm; I: 11–13 mm; S≥14 mm

نتایج تری‌متوپرین بر اساس: R ≤25 mm; I: 26–29 mm; S≥30 mm

نتایج سیپروفلوکساسین بر اساس: R ≤15 mm; I: 16–20 mm; S≥21 mm

نتایج سفالکسین بر اساس: R ≤14 mm; I: 15–17 mm; S≥18 mm

نتایج آموکسی‌سیلین-کلاوولانیک‌اسید بر اساس: R ≤13 mm; I: 14–17 mm; S≥18 mm

نتایج ونکومایسین بر اساس: R ≤14 mm; I: 15–16 mm; S≥17 mm

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

بررسی ژن‌های بیماری‌زا

حضور ژن‌های رمزکننده ۱۰ فاکتور بیماری‌زای شناخته‌شده در سویه‌های مورد آزمایش بررسی شد. نتایج تکثیر PCR نشان داد که سویه‌های A21 و A11 فاقد تمامی ژن‌های بیماری‌زای مورد آزمایش بودند. در حالی‌که سویه A14 وجود ژن *esp* را نشان داد و سویه‌های A18 و A23 دارای ژن بیماری‌زای *cpd* بودند. همچنین سویه A28 دارای ژن‌های بیماری‌زای *ccf*، *esp*، و *cpd* بودند.

شناسایی مولکولی

قطعات PCR تکثیر شده متعلق به ژن *16S-rRNA* سویه‌های باکتریایی که بهترین نتایج را نشان دادند تعیین توالی شدند. بر اساس نتایج، سویه A11 متعلق به *L. lactis* (درصد مشابهت ۱۰۰٪)، سویه A14 متعلق به *E. durans* (درصد مشابهت ۹۹/۶۷)، سویه A18 متعلق به *E. hirae* (درصد مشابهت ۱۰۰٪)، سویه A21 متعلق به *L. lactis* (درصد مشابهت ۹۹/۸۱)، سویه A23 متعلق به *Enterococcus mundtii* (درصد مشابهت ۱۰۰٪) و سویه A28 متعلق به *E. faecalis* (درصد مشابهت ۱۰۰٪) بود. باکتری‌های پروبیوتیک خوراکی باید از سیستم‌های دفاعی بدن از جمله pH پایین، نمک صفراوی، و شرایط آنزیمی عبور کنند تا در سیستم گوارشی مستقر شده و اثرات ارتقاءدهنده‌ی سلامت را نشان دهند (Duary et al. 2011). بررسی مقاومت در شرایط *in vitro* و *in vivo* نتایج یکسانی را برای زنده‌مانی سلول‌های پروبیوتیک نشان می‌دهند. بنابراین، تحمل باکتری‌ها در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی را می‌توان با روش‌های *in vitro* در pH پایین (pH=۲/۵ به مدت ۳ ساعت)، غلظت نمک صفراوی بالا (۰/۳ درصد (w/v) به مدت ۴ ساعت) و شرایط آنزیمی (پپسین ۰/۵٪ (w/v) و پانکراتین ۰/۱ درصد (w/v) به مدت ۲-۳ ساعت) ارزیابی کرد (Ramos et al. 2013). میزان بقاء پایین در شرایط گوارشی از ۳۴ تا ۶۶ درصد در سویه‌های A3 و A29 مشاهده شد. همچنین، سویه‌های A14، A6، A23، A27 و A28، میزان زنده‌مانی بالاتری را نشان دادند که از ۳۲٪ در شرایط گوارشی معده تا ۷۴٪ در شرایط گوارشی روده متغیر بود. همچنین، سویه‌های A11 و A21 بهترین نتایج را داشتند و تحمل بالایی در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی از خود نشان دادند (۸۵٪-۶۸٪). سایر مطالعات مشابه نشان داده‌اند که قدرت تحمل باکتری‌های LAB در شرایط گوارشی به دلیل ساختار غشایی دو لایه متغییر ولی قابل قبول است (Lye et al. 2010; Miremadi et al. 2014).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

یکی از مهم‌ترین معیارهای انتخاب باکتری‌ها به‌عنوان پروبیوتیک، توانایی آن‌ها برای زنده‌مانی در حین عبور از دستگاه گوارش فوقانی (معده) و رسیدن به روده بزرگ است، جایی‌که این باکتری‌ها ساکن شده و اثرات سودمند خود را نشان می‌دهند. مشابه نتایج این تحقیق، میزان بقاء بالا برای سویه‌های پروبیوتیک مثل *L. plantarum* 15HN، *L. lactis* subsp *cremoris* 44L، *E. faecalis* 13C، *E. mundtii* 50H و *E. durans* 39C در شرایط گوارشی گزارش شده است (Abushelaibi et al. 2017). هر ۹ سویه باکتریایی تحمل بالایی در حضور نمک صفراوی نشان دادند که ۴ تا ۲۸ درصد بیشتر از تحمل آن‌ها در pH پایین بود. نمک‌های صفراوی به دلیل مکانیسم‌های سازگاری در برابر استرس، اثرات کشنده کمتری نسبت به شرایط اسیدی بر روی سلول‌های باکتریایی دارند (Campana et al. 2017). بر اساس نتایج، هر ۹ سویه باکتریایی پس از قرار گرفتن در شرایط شبیه‌سازی‌شده گوارشی بقاء خود را حفظ کردند. در نتیجه، این ۹ سویه برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شدند.

یکی از ویژگی‌های مورد انتظار در باکتری‌های پروبیوتیک داشتن عملکرد مهاری قابل قبول بر علیه عوامل بیماری‌زا است. بنابراین، فعالیت‌های آنتاگونیستی ۹ سویه انتخاب شده بر علیه ۸ بیماری‌زا گرم مثبت و گرم منفی مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری‌های پروبیوتیک متعلق به گروه LAB از طریق ترکیبی از مکانیسم‌های مختلف مانند تولید و ترشح پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، اسیدهای آلی (اسید لاکتیک) و پروتئین‌های مهاری (باکتریوسین) از رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند (Temmerman et al. 2003). این تحقیق مشابه یافته‌های دیگر نشان داد که فعالیت‌های ضد بیماری‌زایی سویه‌های مورد آزمایش به‌طور عمده با قابلیت تولید اسید و ترشح پراکسید هیدروژن مرتبط است (Coppola et al. 2005; Neut et al. 2017). از سوی دیگر، فعالیت ضد بیماری‌زایی ناشی از ترشح باکتریوسین بر علیه تعداد محدودی از عوامل بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی مشاهده شد. این نتایج در تضاد با مطالعاتی است که نشان می‌دهند، باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های LAB فقط بر روی بیماری‌زاهای گرم مثبت مؤثر هستند و به دلیل غشای خارجی بیماری‌زاهای گرم منفی هیچ تأثیری بر روی آن‌ها ندارند (Bernardeau et al. 2008; Selvin et al. 2020). برخی بیماری‌زاها مانند *Y. enterocolitica* و *K. pneumoniae* علاوه‌بر شیوع بالا، مقاومت بالایی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها از خود نشان می‌دهند. بنابراین، سویه‌های باکتری LAB جدا شده از منابع لبنی می‌توانند بر علیه بیماری‌زاهای گرم منفی مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار گیرند (Liu et al. 2015; Nami, Vaseghi Bakhshayesh et al. 2019). سویه‌های LAB انتخابی فعالیت همولیتیکی بتا نداشتند. همچنین اکثر سویه‌ها فعالیت همولیتیکی گاما را نشان ندادند. نتایج مشابه نشان داده‌اند که اکثر سویه‌های LAB هیچ فعالیت همولیتیک ندارند. اما طبق دستورالعمل‌ها، عدم همولیز سلول‌های خونی، ایمنی باکتری‌های پروبیوتیک را ثابت نمی‌کند (Nami, Vaseghi Bakhshayesh et al. 2019). بررسی ظرفیت چسبندگی باکتری‌ها به فاز آبگریز حلال مورد استفاده (آبگریزی سطح سلول) برای تعیین توانایی چسبیدن باکتری‌ها به مخاط روده و جلوگیری از چسبیدن بیماری‌زاها به روده و آلودگی سیستم گوارش ضروری است (Ben Amor et al. 2007; Pogačić et al. 2013). همسو با نتایج قبلی، باکتری‌های پروبیوتیک شناسایی‌شده به‌طور عمده آبگریزی سطح سلولی قابل قبولی به نمایش گذاشتند. همچنین، تفاوت در میزان تولید پروتئین‌های سطحی می‌تواند منجر به طیف گسترده‌ای از آبگریزی سطح سلولی در باکتری‌های LAB شود (Noori et al. 2013). از سوی دیگر این مطالعات ارتباط بین آبگریزی سطح سلولی و توانایی چسبندگی باکتری‌ها را اثبات کرده‌اند (Mehrabian et al. 2012). پتانسیل اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده یکی دیگر از خصوصیات انتخابی پروبیوتیک‌ها است. بنابراین چسبندگی سلولی به‌عنوان استانداردی برای انتخاب یک باکتری پروبیوتیک بالقوه در نظر گرفته می‌شود (Duary et al. 2011).

باکتری‌های پروبیوتیک برای اینکه در روده کلنیزه شوند، باید به مخاط روده چسبیده و به سادگی با حرکات دودی روده از روده خارج نشوند. همسو با نتایج مطالعات دیگر، یافته‌های مطالعه حاضرنشان داد فقط برخی از سویه‌های LAB می‌توانند به خوبی به سلول‌های Caco-2 بچسبند (Ramos et al. 2013). توانایی جذب بالای کلسترول در سویه‌هایی مثل A11، یکی دیگر از ویژگی‌های مهم و ضروری برای معرفی و انتخاب پروبیوتیک‌ها است. شواهد نشان می‌دهد که اثرات هیپوکلسترولمی منشأ گرفته از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به دلیل جذب کلسترول یا اتصال کلسترول به سطح سلول‌های باکتری باشد (Lye et al. 2010). پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های مختلفی مانند تبدیل کلسترول به کوپروستانول

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

توسط آنزیم ردوکتاز، ادغام کلسترول در دیواره سلولی و اختلال در تشکیل میسل کلسترول در روده توسط نمک صفراوی دکونژوگه، باعث کاهش کلسترول می‌شوند (Miremadi et al. 2014).

توانایی تجمع خودکار و مشترک دو ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک است که به‌ترتیب به‌عنوان تجمع باکتری‌های گونه‌های مشابه و یا گونه‌های مختلف تعریف می‌شوند (Campana et al. 2017). این دو ویژگی برای پروبیوتیک‌ها اساسی هستند، زیرا به نظر می‌رسد که تجمع خودکار با چسبندگی پروبیوتیک‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده مرتبط است، در حالی‌که تجمع مشترک یک مانع دفاعی برای استقرار و تثبیت میکروارگانیسم‌های بیماری زا است (Abushelaibi et al. 2017). نتایج تأییدکننده این فرضیه است و سویه‌های A18 و A34 که بهترین قابلیت آبگریزی و چسبندگی را به سلول‌های اپیتلیال روده داشتند، همچنین بهترین توانایی تجمع خودکار و مشترک را نشان دادند.

مصرف بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ظهور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های پروبیوتیک شده و با انتقال این ژن‌ها به سایر میکروارگانیسم‌های ساکن در دستگاه گوارش به‌خصوص بیماری‌زاها، مشکلات مرتبط با مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایجاد می‌شود. بنابراین، حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از ویژگی‌های اساسی انتخاب پروبیوتیک است (Temmerman et al. 2003). حساسیت بالا به آنتی‌بیوتیک‌ها در ۶ سویه جدا شده (A11، A14، A18، A21، A23 و A28) احتمالاً به دلیل استفاده محدود از آنتی‌بیوتیک‌های حیوانی در مناطق روستایی استان کرمانشاه است. ولی برخلاف این نتایج ، مقاومت بالای باکتری‌های LAB به آنتی‌بیوتیک‌های ذکرشده توسط سایر محققان گزارش شده است (Coppola et al. 2005; Neut et al. 2017; Selvin et al. 2020). هر ۶ سویه جدا شده در برابر سیپروفلوکساسین و وانکومایسین مقاومت نشان دادند. از سوی دیگر، مقاومت به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول در سویه‌های A23، A18، A11 و A28 مشاهده شد. سویه‌های مختلف گروه LAB مانند جنس *Lactobacillus* حامل ژن‌های مقاومت به تری‌متوپریم سولفامتوکسازول، سیپروفلوکساسین و وانکومایسین هستند که نتایج ما را تأیید می‌کنند (Bernardeau et al. 2008; Noor Uddin et al. 2015).

یکی از سموم باکتریایی که توسط برخی از سویه‌های گروه LAB تولید می‌شود، سیتولیزین

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

است. بنابراین عدم وجود ژن رمزکننده سیتولیزین یک ویژگی مطلوب برای پروبیوتیک‌های مورد استفاده در صنایع غذایی است. در این تحقیق سویه‌ها حامل ژن‌های رمزکننده سیتولیزین (*cylA* و *cylB*) نبودند. علاوه‌بر این، تنها سویه A14 وجود ژن *esp* را نشان داد و سویه‌های A18 و A23 حامل ژن بیماری‌زای *cpd* بودند. همچنین سویه A28 حامل ژن‌های بیماری‌زای *ccf*، *esp* و *cpd* بود که فاکتورهای بیماری‌زایی را رمز می‌کنند. این نتایج مطابق با نتایج لیو و همکاران و نامی و همکاران است که به‌طور کلی نشان می‌دهد وجود ژن‌های بیماری‌زایی در سویه‌های گروه LAB کمتر از سایر سویه‌های باکتریایی است (Liu et al. 2015; Nami, Vaseghi Bakhshayesh et al. 2019). بر اساس دستورالعمل‌های FAO/WHO، تجزیه و تحلیل و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از تکثیر و توالی‌یابی ژن *16S-rRNA* می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک در دسترس، مقرون به صرفه و مناسب در مقایسه با سایر تکنیک‌های مولکولی که پرهزینه و زمان‌بر هستند در نظر گرفته شد (Ben Amor et al. 2007). این روش به‌عنوان تکنیکی مؤثر برای شناسایی باکتری‌های گروه LAB متعلق به جنس‌های *Lactobacillus*، *Leuconostoc* و *Enterococcus* که از محصولات لبنی جدا شده‌اند، مورد استفاده قرار گرفته است (Pogačić et al. 2013). بر این اساس، نتایج نشان می‌دهد که هر ۶ سویه باکتریایی جدا شده از محصولات لبنی به‌خوبی تجزیه و تحلیل شده و تا سطح گونه با روش توالی‌یابی ژن *16S-rRNA* شناسایی شده‌اند.

نتیجه‌گیری

توالی‌یابی ژن *16S-rRNA* با قدرت تشخیص بالا می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مؤثر، کم هزینه و سریع برای شناسایی و تمایز باکتری‌های گروه LAB جدا شده از محصولات لبنی مورد استفاده قرار گیرد. یافته‌ها نشان داد که در بین سویه‌های آزمایش شده، سویه *L. lactis* A11 و *L. lactis* A21 که از آغوز جدا شده‌اند، به‌عنوان سویه‌های ایمن، دارای بالاترین امتیاز پروبیوتیکی مانند تحمل بالا به pH پایین و غلظت بالای نمک صفراوی در شرایط گوارشی، فعالیت ضد بیماری‌زایی مطلوب، آبگریزی سطح سلولی قابل قبول، چسبندگی سلولی بالا، جذب کلسترول بیشتر، تجمع خودکار و مشترک ایده‌آل و حساسیت آنتی‌بیوتیکی قابل قبول بودند. از اینرو، این سویه‌های باکتری دارای ظرفیت و پتانسیل کافی جهت معرفی به‌عنوان پروبیوتیک هستند.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

سپاسگزاری

به این وسیله نویسندگان تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به‌خاطر همکاری در تأمین هزینه‌های مورد نیاز و به سرانجام رساندن این پروژه اعلام می‌دارند. این پروژه توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه حمایت شده است (پروژه مصوب شماره ۹۹۰۴۴۵). همچنین نویسندگان اعلام می‌دارند که در فرآیند انجام پژوهش و گزارش نتایج بی‌طرفی رعایت شد و این مطالعه هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارد.

فهرست منابع

References

Abushelaibi A, Al-Mahadin S, El-Tarabily K, Shah NP, Ayyash M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT-food Science and Technology. 79: 316-325.

Angmo K, Kumari A, Bhalla TC. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT-food Science and Technology. 66: 428-435.

Ben Amor K, Vaughan EE, de Vos WM. 2007. Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. The Journal of nutrition. 137(3): 741S-747S.

Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. International journal of food microbiology. 126(3): 278-285.

Campana R, van Hemert S, Baffone W. 2017. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. Gut pathogens. 9(1): 1-12.

Coppola R, Succi M, Tremonte P, Reale A, Salzano G, Sorrentino E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. Le Lait. 85(3): 193-204.

Duary RK, Rajput YS, Batish VK, Grover S. 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. The Indian journal of medical research. 134(5): 664.

Kiani A, Nami Y, Hedayati S, Jaymand M, Samadian H, Haghshenas B. 2021. Tarkhineh as a new microencapsulation matrix improves the quality and sensory characteristics of probiotic *Lactococcus lactis* KUMS-T18 enriched potato chips. Scientific Reports. 11(1). 1-13.

Kiani A, Nami Y, Hedayati S, Komi DEA, Goudarzi F, Haghshenas B. 2021. Application of Tarkhineh fermented product to produce potato chips with strong probiotic properties, high shelf-life, and desirable sensory characteristics. Frontiers in microbiology: 12.

Kouhi F, Mirzaei H, Nami Y, Khandaghi J, Javadi A. 2021. Potential probiotic and safety characterisation of Enterococcus bacteria isolated from indigenous fermented Motal cheese. International Dairy Journal. 105247.

Liu Y, Qin R, Zaat SA, Breukink E, Heger M. 2015. Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections. Journal of Clinical and Translational Research. 1(3): 140.

Lye HS, Rahmat-Ali GR, Liong MT. 2010. Mechanisms of cholesterol removal by lactobacilli under conditions that mimic the human gastrointestinal tract. International Dairy Journal. 20(3): 169-175.

Mehrabian S, Tajabadi-Ebrahimi M, Abbas-Ahmadi M, Bahrami H. 2012. Study of antimutagenic and anticancer effect of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh by Ames Test. Journal of Arak University of Medical Sciences. 15(7): 72-79.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

Miremadi F, Ayyash M, Sherkat F, Stojanovska L. 2014. Cholesterol reduction mechanisms and fatty acid composition of cellular membranes of probiotic Lactobacilli and Bifidobacteria. Journal of Functional Foods. 9: 295-305.

Nami Y, Bakhshayesh RV, Manafi M, Hejazi MA. 2019. Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic *Lactobacillus plantarum* YS5 isolated from yogurt. LWT. 111: 876-882.

Nami Y, Haghshenas B, Bakhshayesh RV, Jalaly HM, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA. 2018. Novel autochthonous lactobacilli with probiotic aptitudes as a main starter culture for probiotic fermented milk. LWT. 98: 85-93.

Nami Y, Haghshenas B, Khosroushahi AY. 2018. Molecular identification and probiotic potential characterization of lactic acid bacteria isolated from human vaginal microbiota. Advanced pharmaceutical bulletin. 8(4): 683.

Nami Y, Panahi B, Jalaly HM, Bakhshayesh RV, Hejazi MA. 2020. Application of unsupervised clustering algorithm and heat-map analysis for selection of lactic acid bacteria isolated from dairy samples based on desired probiotic properties. LWT. 118: 108839.

Nami Y, Vaseghi Bakhshayesh R, Mohammadzadeh Jalaly H, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA. 2019. Probiotic properties of Enterococcus isolated from artisanal dairy products. Frontiers in microbiology. 10: 300.

Neut C, Mahieux S, Dubreuil L. 2017. Antibiotic susceptibility of probiotic strains: Is it reasonable to combine probiotics with antibiotics? Medecine et maladies infectieuses. 47(7): 477-483.

Noor Uddin GM, Larsen MH, Christensen H, Aarestrup FM, Phu TM, Dalsgaard A. 2015. Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. PloS one. 10(7): e0132338.

Noori A, Keshavarzian F, Mahmoudi S, Yousefi M, Nateghi L. 2013. Comparison of traditional Doogh (yogurt drinking) and Kashk characteristics (Two traditional Iranian dairy products). European Journal of Experimental Biology. 3(6): 252-255.

Pogačić T, Mancini A, Santarelli M, Bottari B, Lazzi C, Neviani E, Gatti M. 2013. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. Food microbiology. 36(2): 207-215.

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.

Selvin J, Maity D, Sajayan A, Kiran GS. 2020. Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements. Journal of global antimicrobial resistance. 22: 202-205.

Singh S, Goswami P, Singh R, Heller KJ. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. LWT-food Science and Technology. 42(2): 448-457.

Tabatabaei Yazdi F, Alizadeh-Behbahani B, Mortazavi A. 2013. Effect of temperature and salt concentration on microbial changes during Tarkhineh fermentation. Scientific Journal of Biological Sciences. 2(1): 8-16.

Tafvizi F, Tajabadi Ebrahimi M. 2012. Detection of genetic diversity and classification of Lactobacillus species isolated from Iranian traditional dairy products by RAPD fingerprinting and POPGENE analysis. Annals of Biological Research. 3(10): 4904-4911.

Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. 2003. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. International journal of food microbiology. 81(1): 1-10.

Yang M, Jiang R, Liu M, Chen S, He L, Ao X, Zhou K. 2017. Study of the probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese traditional fermented pickles. Journal of Food Processing and Preservation. 41(3): e12954.

Zuo F, Yu R, Feng X, Chen L, Zeng Z, Khaskheli GB, Chen S. 2016. Characterization and in vitro properties of potential probiotic *Bifidobacterium* strains isolated from breast-fed infant feces. Annals of Microbiology. 66(3): 1027-1037.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]

Probiotic Potential and Safety Evaluation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Colostrum

Babak Haghshenas[1], Amir Kiani[2], Yousef Nami[3*]

1- Assistant Professor of Regenerative Medicine Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

2- Associated Professor of Regenerative Medicine Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

2- Assistant Professor of Food Biotechnology Institute, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Iran.

y.nami@abrii.ac.ir

Abstract

Probiotics are live microorganisms that, when consumed in sufficient quantities, show obvious health effects on the consumer. Probiotics mainly belong to the Lactic Acid Bacteria (LAB) group, which can be isolated from traditional dairy sources. Therefore, this study aimed to isolate, identify and investigate the probiotic properties of LAB strains from Colostrum in Kermanshah Province. Tolerance of strains under simulated gastrointestinal conditions including low pH (pH 2.5 for 3 h), high bile salt (0.3% (w/v) for 4 h), and enzymatic conditions (5% pepsin (w/v) and pancreatin 0.1% (w/v) for 2-3 hours) was assessed and then their antagonistic activity was evaluated against 8 Gram-positive and Gram-negative pathogens. Hemolytic activity, adhesion capacity to the hydrophobic phase, and potential binding to intestinal epithelial cells were investigated. On the other hand, the efficiency of cholesterol removal from the culture medium and the ability of auto- and co-aggregation were investigated. Finally, the presence of virulence genes encoding ten pathogens and assessing antibiotic susceptibility to nine important and widely used antibiotics were performed. The results revealed that *Lactococcus lactis* A11, and *L. lactis* A21 are safe and showed higher tolerance to low pH and bile salt in gastrointestinal conditions, favorable anti-pathogenic activity, acceptable cell surface hydrophobicity, high cell adhesion, higher cholesterol uptake, ideal auto- and co-aggregation, and acceptable antibiotic susceptibility; so they could be considered as novel candidates of probiotics for use in the food industry.

Keywords: Probiotics, Lactic Acid Bacteria, Colostrum, Antagonistic activity, Antibiotic susceptibility.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1400.14.3.5.6]