

## تعیین الگوی ساختاری متابولیت های ضد میکروبی لاکتوباسیلوس های جدا شده از سبزیجات

جمالی، فاطمه<sup>۱</sup>، باصری صالحی، مجید<sup>۲</sup>، بهادر، نیما<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه میکروبیولوژی.

<sup>۲</sup> عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه میکروبیولوژی.

<sup>۳</sup> عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، گروه میکروبیولوژی.

نویسنده مسوول : مجید باصری صالحی

**Email:majidbaseri@hotmail.com**

**Tel: 09173043055**

### چکیده

هدف از این تحقیق ارزیابی الگوی ساختار متابولیت های ضد میکروبی لاکتوباسیلوس های بومی است که توانایی ممانعت از رشد باکتری های بیماری زای روده ای را دارند. برای انجام این تحقیق، سوش های لاکتوباسیلوس از ۵۰ نمونه سبزیجات جدا گردیدند و از نظر تولید متابولیت ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس جدایه های تولید کننده متابولیت های ضد میکروبی مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی (16srRNA) قرار گرفتند و فاز تولید برای هر جدایه ارزیابی گردید. از میان این جدایه ها، ۲ گونه لاکتوباسیلوس قادر به تولید متابولیت های ضد میکروبی قوی تری نسبت به بقیه بودند. در ادامه ی این تحقیق ساختمان شیمیایی متابولیت های ضد میکروبی به وسیله ی روش های HPLC و SDS-PAGE مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج بدست آمده نشان داد که ۲ نمونه ی لاکتوباسیلوس پلانتاروم DSM۲۰۲۰۵ و لاکتوباسیلوس رامنوسوس JCM۱۱۳۶، قادر به تولید متابولیت های ضد میکروبی می باشند. این جدایه ها بر روی باکتری های سالمونلا تایفی موریوم، سودوموناس آئروجینوزا، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولی، و قارچ های آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکانس اثر ممانعت کنندگی از رشد را نشان دادند.

نتایج حاصل از HPLC و SDS-PAGE بیانگر وجود ساختاری مشابه لاکتوسین و اسید های آلی در ترکیبات تولیدی توسط جدایه ها بوده است که شواهدی برای معرفی این جدایه ها بعنوان پروبیوتیک می باشد.

## ۱. مقدمه

مانند دی استیل، آمونیاک، اتانل، دی آمین استوئین، استالدئید، بنزوات، لانتی بیوتیک ها، آنتی بیوتیک ها (Servin, 2004). اثر بازدارندگی رشد توسط برخی از این مواد بر پاتوژن های روده و میکروارگانیسم های فاسد کننده نظیر باسیلوس ها و استافیلوکوکوس ها به اثبات رسیده است. لاکتوباسیل ها با منشاء انسانی اثر آنتاگونیستی بر پاتوژن های گوارشی - روده ای مختلف نظیر هلیکوباکتر پیلوری، اشریشیاکلی و کمپیلو باکتر ژژونی دارند (Strus *et al.*, 2001). باکتریوسین های تولید شده توسط لاکتوباسیل ها، پپتیدها یا پروتئین های ضد میکروبی هستند که معمولاً از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری می کنند (Lue De Vuyst, 1995). درحالی که ترکیبات تولید شده با جرم مولکولی کم، مثل اسید لاکتیک، رشد پاتوژن های گرم منفی را مهار می کنند (Aroutcheva *et al.*, 2001). فعالیت ضد میکروبی اکثر لاکتوباسیل ها به علت تولید اسید لاکتیک است، اما مواد ضد میکروبی دیگر نظیر ترکیبات آروماتیک و مولکول های هتروسیکلیک و مولونولاکتون نیز به وسیله لاکتوباسیل ها تولید می شود که در pH اسیدی و در حضور اسید لاکتیک بر باکتری های گرم منفی، مؤثر هستند (Padmanabha *et al.*, 2006). با توجه به اهمیت سویه های بومی پروبیوتیکی و استفاده از

میکروارگانیسم هایی به عنوان پروبیوتیک مورد توجه قرار می گیرند که بتوانند از معده و روده عبور کنند، در مجرای گوارشی تکثیر یابند و با تولید متابولیت های آنتاگونیستی با میکروفلور ساپروفیت رقابت کنند. این توانایی در بین لاکتوباسیل ها وجود دارد. لاکتوباسیلوس ها از جمله باکتری های پروبیوتیک هستند که گرم مثبت، میله ای شکل با انتهای گرد، غیر متحرک، بدون تولید اسپور و کاتالاز منفی بوده که بیشتر در محصولات لبنی مانند ماست، شیر، پنیر و محصولات غیر لبنی نظیر سبزیجات دیده می شوند (Williams, 1986). فعالیت بازدارندگی لاکتوباسیلوس ها، به سیستم های پیچیده آنتاگونیستی تولید شده توسط کشت های آغازگر بستگی دارد. توانایی تولید و ترشح انواع مواد بازدارنده به رشد میکروارگانیسم ها و قدرت بقای آن ها بستگی دارد (Kandler and Norbert, 1989). این مواد عبارتند از: کاتابولیت های قندی مثل اسید های آلی (اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید فرمیک)، کاتابولیت های اکسیژن دار نظیر پراکسید هیدروژن، ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین ها، پپتیدهایی با وزن مولکولی کم، پپتیدها و پروتئین های ضد قارچی، متابولیت های چربی، اسید های آمینه و اسید های چرب، فنیل لاکتیک اسید و هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید و دیگر ترکیبات

آنها برای عملکرد ضد میکروبی، هدف از انجام این تحقیق، جداسازی سویه های پروبیوتیکی از نمونه سبزیجات محلی و بررسی توان تولید متابولیت های ضد میکروبی به منظور ارزیابی تعیین ساختار شیمیایی آن ها بود.

## ۲- مواد و روش ها

### ۲-۱- جمع آوری نمونه ها و جداسازی لاکتوباسیلوس ها

در این تحقیق ۵۰ نمونه از سبزیجات محلی استان فارس جمع آوری گردید. جهت جمع آوری نمونه ها در ظروف استریل به آزمایشگاه انتقال یافتند. رقیق سازی نمونه های جمع آوری شده با استفاده از محلول رینگر تا رقت  $10^{-7}$  انجام گرفت. سپس از رقت های مختلف ۱ میلی لیتر سوسپانسیون برداشته و بر روی محیط کشت MRS جامد به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآنروفل در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس گرمخانه گذاری شدند (Hardie, 1986).

### ۲-۲- ارزیابی تولید متابولیت های ضد میکروبی

جهت ارزیابی تولید متابولیت های ضد میکروبی بوسیله ی جدایه های لاکتوباسیلوس از کشت ۴۸ ساعته ی این باکتری ها استفاده شد. ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون کشت جدایه ها به طور جداگانه برداشت شده و در دور ۸۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. متعاقب این عمل محیط کشت مولر هینتون تهیه گردید و باکتری

های اشرشیاکولی، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تایفی موریوم، سودوموناس آئروجینوزا و قارچ های آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکانس بر روی آن کشت داده شد. سپس با استفاده از بورل استریل چاهک هایی روی محیط کشت داده شده ، تعبیه گردید و ۲۰۰ ماکرولیترا از مایع رویی کشت های ۴۸ ساعته سانتریفیوژ شده درون چاهک ها ریخته شد. پلیت های تهیه شده به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه ی سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. پس از این دوره مشاهده منطقه ی ممانعت کننده از رشد بر روی محیط مولر هینتون به عنوان پتانسیل تولید متابولیت های ضد میکروبی به وسیله ی جدایه ها قلمداد گردید و اثر ضد میکروبی این ترکیبات بر روی باکتری ها و قارچ های مورد استفاده تعیین و ثبت گردید.

### ۲-۳- شناسایی فنوتیپی و مولکولی جدایه های تولید

#### کننده ی متابولیت های ضد میکروبی

مشخصات ماکروسکوپی جدایه های های تشکیل شده روی محیط کشت از قبیل رنگ، شکل، قوام و اندازه و مشخصات میکروسکوپی پس از رنگ آمیزی گرم و انجام مشاهدات مورد بررسی قرار گرفت (Naderi-Nasab, 1996). همچنین از آزمون های بیوشیمیایی نظیر تست کاتالاز، اکسیداز، اکسیداتیو/ فرمنتاتیو، تست احیای نیترات، و توانایی استفاده از قندهای گلوکز، سوکروز، ساکارز، گالاکتوز، لاکتوز، آرابینوز، ترهالوز، زیلوز، اینولین،

مالتوز، مانوز، رامنوز، رافینوز، مانیتول، دکستروز، ملی بیوز، سلوبیوز، سوربیتول، سالیسین استفاده شد. پس از تلقیح نمونه های باکتریایی به محیط های کشت فوق، نمونه ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درون جار به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری و نتایج بررسی شدند (Kandler and Nobert, 1989). همچنین برای شناسایی باکتری ها به روش مولکولی استخراج DNA با کمی تغییرات به روش لان مورد استفاده قرار گرفت (Lane, 1991). در مطالعه حاضر، از یک مجموعه ی پرایمر عمومی 5'- (27F AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') و 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT- (1492R 3') جهت تکثیر این قطعه ژنی استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم واکنش  $25\ \mu\text{l}$  شامل مخلوط 0.25 mM، 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ، 1X Taq Master پرایمر فوروارد، 0.25 mM پرایمر ریورس و 0.4 ng ژنوم DNA انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در  $95^{\circ}\text{C}$  و با انجام ۴۰ سیکل متوالی در  $95^{\circ}\text{C}$  در مدت ۳۰s،  $55^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵۰s،  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱ دقیقه و در و در پایان  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید. الگوی بانندی محصول PCR، توسط الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ (w/v) با ولتاژ ۷۰ به مدت ۱ ساعت انجام شد. از بافر TAE برای تهیه ژل و نیز به عنوان بافر تانک الکتروفورز استفاده گردید. برای تعیین اندازه محصولات PCR، نشانگر اندازه مولکولی (۱Kb ۰۳۷۳ Fermentase

#### ۲-۴- تعیین فاز تولید متابولیت های ضد میکروبی جدایه

ها

در این آزمایش ابتدا کلنی های رشد یافته روی محیط جامد MRS (محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس) مجدداً بر روی محیط مایع MRS کشت داده شدند. محیط کشت ها در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  درجه ی سلسیوس، در شرایط میکروآتروفیل به مدت های ۶، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در این بررسی برای مقایسه میزان رشد در پایان دوره های زمانی تعیین شده جذب نوری نمونه ها در طول موج  $560\ \text{nm}$  توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد و آنالیز آماری صورت گرفت و پس از آن نمونه ها در دور  $8500\ \text{rpm}$  به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند و مایع رویی برای بررسی فعالیت ضد میکروبی جدا گردید به متعاقب آن محیط جامد مولر

هینتون تهیه و ب باکتری های اشرشیاکولی، استافیلوکوکوس اوروتوس، سالمونلا تایفی موریوم، سودوموناس ایروجینوزا و قارچ های اسپرجیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکانس بر روی آن کشت داده شد. سپس با استفاده از بورل استریل چاهک هایی بر محیط کشت داده شده، تعبیه گردید و ۲۰۰ ماکرولیترا از مایع رویی کشت های ۴۸ ساعته سانتریفیوژ شده درون چاهک ها ریخته شد. پلیت های تهیه شده به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه ی سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. پس از این دوره مشاهده منطقه ی ممانعت کننده از رشد بر روی محیط مولر هینتون در فازهای رشد مختلف ثبت گردید و توسط آنالیز آماری بهترین دوره ی زمانی برای تولید بیشترین ماده ی ضد میکروبی با توجه به قطر هاله ها در بازه های زمانی مختلف تعیین شد (Pourahmad, 2004).

#### ۲-۵- خالص سازی متابولیت های ضد میکروبی

جهت خالص سازی متابولیت های ضد میکروبی از کشت ۴۸ ساعته ی لاکتوباسیلوس ها استفاده گردید. بدین گونه که مایع رویی کشت ۴۸ ساعته لاکتوباسیلوس ها پس از سانتریفیوژ در دور ۸۵۰۰ rpm در مدت زمان ۱۵ دقیقه جدا گردید. مایعات رویی مربوط به هر جدایه به ارلن انتقال داده شد و سولفات آمونیوم به میزان ۵۰ درصد از حجم مایع رویی به ارلن ها افزوده شد سپس ارلن ها درون ظروف حاوی یخ گذاشته شدند و بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند و پس از آن

به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه ی سلسیوس نگه داری شدند. بعد از این مدت زمان محلول های درون ارلن ها مربوط به هر جدایه به طور جداگانه در دور ۳۸۰۰rpm به مدت ۴۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (Ennahar and Deachamrs, 2000). سپس مایع رویی و رسوب از هم جدا شد و رسوب با ۱ میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵ (pH=7) مخلوط گردید. پس از آن کیسه های دیالیز KD۱۲۰۰ به اندازه ی ۲\*۲ سانتی متر آماده گردیدند. مخلوط رسوب و بافر مربوط به هر جدایه به به طور جداگانه درون کیسه های دیالیز مجزا ریخته شدند (دو طرف کیسه ها به وسیله نخ محکم بسته شد) سپس درون ارلن های حاوی ۲۰۰ میلی لیتر فسفات ۵ درصد (pH=7) قرار داده شدند و به مدت ۴۸ در دمای ۴ درجه ی سلسیوس نگهداری شدند (هر ۱۸ ساعت بافر تعویض گردید). پس از این مدت زمان کیسه ها از ارلن ها خارج گردیده و برای تغلیظ متابولیت های ضد میکروبی به محلول سوکروز اشباع انتقال یافت پس از ۱۲ ساعت کیسه از درون محول خارج شدند و مایع باقی مانده در کیسه ها به تیوپ های اپندروف انتقال داده شدند. ۲۰۰ ماکرولیترا از این مایعات جدا شده مربوط به هر جدایه درون چاهک های تعبیه شده بر روی محیط های مولر هینتون جامد که به طور جداگانه اشرشیا کولی و سالمونلا تایفی موریوم بر روی آن ها کشت داده شده بود ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردید تا با اندازه گیری منطقه ی

ممانعت از رشد خاصیت ضد میکروبی مواد استخراج شده به اثبات برسد (Ogunbanwo and *et al.*, 2003).

## ۲-۶- تعیین ساختار احتمالی متابولیت های ضد میکروبی با استفاده از HPLC و SDS-PAGE

در این روش از تفاوت وزن مولکولی و بارالکتریکی پروتئین ها به طور همزمان برای تفکیک آنها از یکدیگر استفاده شد. اساس این روش بر مبنای حرکت مولکول های باردار در یک میدان الکتریکی مشخص شده است. برای شناسایی پروتئین های موجود در نمونه ها از وزن مولکولی آنها استفاده می گردد. در این روش از الکتروفورز با استفاده از ژل آکریل آمید ۱۵ درصد با سیستم ناپیوسته تحت شرایط دناتور کننده SDS-PAGE استفاده می گردد. برای مشاهده باندها از روش تکنیک رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده می شود. جهت انجام این امر SDS به پروتئین ها اضافه می گردد و پس از اضافه کردن بافر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده می شوند. پس از این مدت زمان نمونه به داخل حفراتی که در ژل ایجاد می شود ریخته خواهد شد. جهت تفکیک باندهای پروتئینی از ولتاژ ۹۰ آمپر استفاده می شود. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در رنگ کوماسی قرار گرفت و پس از رنگ بری با محلول رنگ بر (تانول + اسید استیک)، باندهای پروتئین آشکار و نتایج به صورت عکس برداری ثبت شدند (Johanstone and Thorpe, 1987). همچنین برای تعیین وجود احتمالی اسیدهای آلی

موجود در ترکیبات فعال زیستی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده گردید. بدین صورت که ترکیب فعال زیستی بدون اینکه فرایند دیالیز بر روی آن انجام گیرد از میان فیلتر  $0.45\mu\text{m}$  دستگاه HPLC عبور داده شد. بعد از آن ۲۰ میکرولیتر نمونه هیدرولیز شده را در دو تکرار با سرنگ ۲۰ میکرولیتری همیلتون به ستون جداکننده (ستون SCR(N) به ابعاد ۷,۹ در ۴۰ ml) محتوای آمینو پروپیل تزریق گردید. از محلول سدیم سولفات به عنوان فاز متحرک با شدت جریان ۰/۷۵ میلی متر در دقیقه به عنوان جدا کننده، استفاده گردید. سپس از آشکارگر UV-VIS برای تعیین ترکیبات شیمیایی نمونه های مورد نظر استفاده و نمودار های بدست آمده به عنوان داده ثبت و اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی ها و زمان ماندگاری آنها محاسبه گردید (Dokhani, *et al.*, 1988).

## ۲-۷- روش آنالیز آماری

در تحقیق حاضر بطور معمول آزمون ها در سه تکرار انجام گردیدند. سپس از آزمون های آماری دانکن و آنوا جهت ارزیابی نتایج استفاده گردید.

## ۳- نتایج

### ۳-۱- جداسازی و شناسایی فنوتیپی لاکتوباسیلوس ها

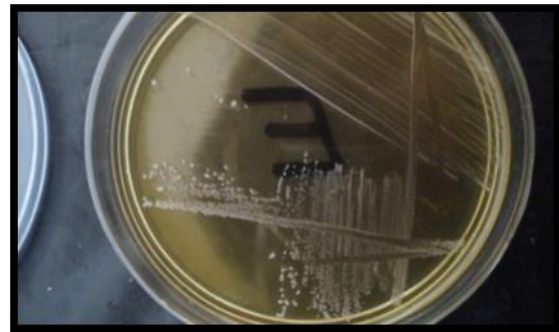
شکل ۲- مشخصات میکروسکوپی لاکتوباسیلوس ها

در این تحقیق ۱۰ لاکتوباسیل از ۵۰ نمونه سبزیجات محلی جداسازی شد. بررسی های ماکروسکوپی نشان داد که پس از گذشت ۴۸ در محیط کشت MRS agar کلنی های دایره ای و عدسی شکل تشکیل شد (شکل ۱). بررسی های میکروسکوپی نیز حضور باسیل های کشیده، فاقد اسپور، گرم مثبت با آرایش زنجیری را نشان داد (شکل ۲). کلیه سویه ها آنزیم های کاتالاز، اکسیداز و هیدرولیز رافینوز را نداشته ولی تماماً از گلوکز استفاده نمودند. تمایز سویه ها از نظر هیدرولیز قندها در جدول ۱ ارائه شده است.

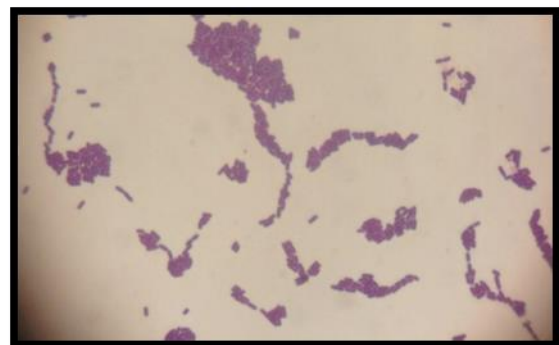
جدول ۱- شناسایی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده

بیوشیمیایی به وسیله آزمون های بیوشیمیایی

جدایه ها		خصوصیات
Aa	Ra	
+	+	واکنش گرم مثبت
-	-	فعالیت کاتالاز
-	-	فعالیت اکسیداز
F	F	اکسیداتیو/ فرمنتاتیو
-	-	تولید دی اکسید کربن از قند
-	-	تست اندول
-	-	تست سیترات
-	-	موتیلیتی
-	-	نیتрат
-	-	متیل رد و وژر پروسکوئر
-	+	تست ژلاتین
-	-	تست همولایزین



شکل ۱- مشخصات ماکروسکوپی لاکتوباسیلوس ها



شده است، متابولیت ضد میکروبی تولیدی توسط جدایه ها بر باکتری های، سودوموناس ائروجینوزا، استافیلوکوکوس ارئوس، سالمونلا تایفی موریوم، اشرشیا کولی و قارچ های آسپرژیلوس نیجر و کاندیدا آلبیکانس اثر داشتند که بیشترین اثر مربوط به سوش Ra و کمترین اثر مربوط به جدایه Aa می باشد. از میکروارگانیسم های بیماری زا باکتری استاف اورئوس و قارچ آسپرژیلوس نیجر دارای بیشترین حساسیت بودند.

جدول ۲- ارزیابی تولید و طیف اثر ترکیبات ضد میکروبی تولیدی توسط جدایه های لاکتوباسیلوس

ممانعت ضد میکروبی توسط جدایه ها (بر حسب میلیمتر)		پاتوژن های بیماری زا
Aa	Ra	
۱۳±۱	۱۴±۱	آسپرژیلوس نیجر
۱۳±۱	۱۵±۱	سودوموناس ائروجینوزا
۱۵±۱	۱۸±۱	استافیلوکوکوس ارئوس
۱۳±۱	۱۶±۱	سالمونلاتایفی موریوم
۱۶±۱	۱۷±۱	اشرشیا کولی
۱۲±۱	۱۵±۱	کاندیدا آلبیکانس

### ۳-۳- شناسایی ژنوتیپی لاکتوباسیلوس ها

از بین ۱۰ ایزوله جدا شده، ۲ جدایه ی Ra و Aa جدا شده از سبزیجات، با پتانسیل پروبیوتیکی جهت شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنتیکی با روش توالی یابی در این

تولید اسید از:		
V	+	آرابینوز
+	+	اسکولین
+	+	ریبوز
+	+	گلوکز
+	V	لاکتوز
+	+	مانوز
+	+	مانیتول
+	+	مالتوز
-	-	رافینوز
-	+	سوربیتول
+	V	سوکروز
+	+	زیلوز
V	V	ملی زیتوز
+	-	تری هالوز
+	-	رامنوز

F: فرمنتاتیو O: اکسیداتیو

### ۳-۲- ارزیابی تولید متابولیت ضد میکروبی توسط جدایه

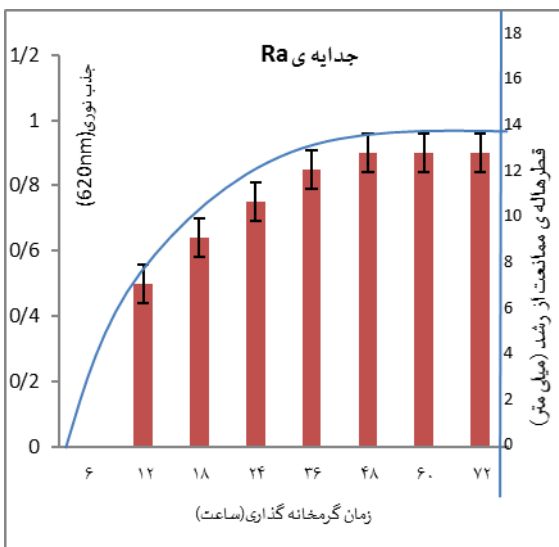
ها

نتایج بدست آمده از ارزیابی تولید متابولیت ضد میکروبی توسط جدایه ها نشان داد که از ۱۰ سویه لاکتوباسیلوس جدا شده ۲ جدایه قادر به تولید متابولیت ضد میکروبی قوی تری بودند. همان گونه که در جدول ۲ نشان داده



بیان نمود که متابولیت های ضد میکروبی در فاز رشد باکتری ها تولید می شوند و می توان تولید این ترکیبات را وابسته به عملکرد ریبوزوم در فاز رشد در نظر گرفت (نمودار ۱ و نمودار ۲).

نمودار ۱- ارزیابی تولید متابولیت ضد میکروبی در فازهای مختلف رشد جدایه ی Ra



نمودار ۲- تولید متابولیت ضد میکروبی در فازهای مختلف رشد جدایه ی Aa

مطالعه انتخاب شدند. بر طبق آنالیزهای فیلوژنی پیشنهاد می شود که باکتری هایی با بیش از ۹۹ درصد تشابه در توالی ژن 16S rRNA متعلق به همان گونه می باشند. پس از انجام توالی یابی، مقایسه هم ردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجام شد و ۹۹ درصد تشابه با لاکتوباسیلوس ها حاصل شد که نتایج آن به صورت خلاصه در جدول ۳ نمایش داده شده است.

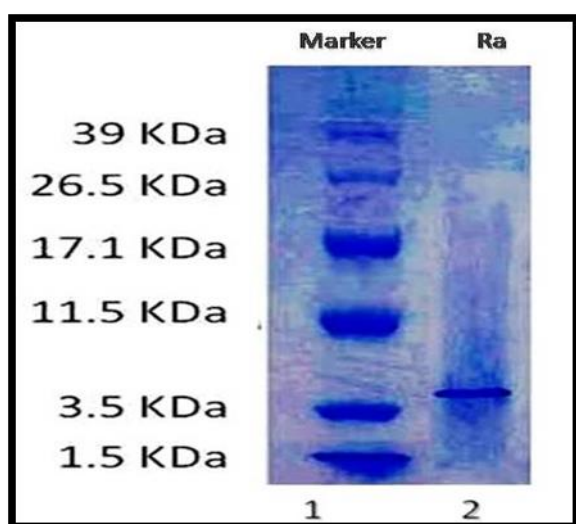
جدول ۳- شناسایی لاکتوباسیلوس ها توسط 16S rRNA sequencing

Ra	Aa	جدایه ها
لاکتو. رامنوسوس	لاکتو. پلانتاروم	شناسایی بیوشیمیایی
لاکتو. رامنوسوس <i>JCM 1136</i>	لاکتو. پلانتاروم <i>DSM 20205</i>	<b>16S rRNA identification</b>
D16552	ACGZ0100 0098	قرابت نزدیکی
٪۹۹/۸	٪۹۹/۹	شناسایی (%)

۴-۳- ارزیابی تولید متابولیت های ضد میکروبی در فازهای رشد

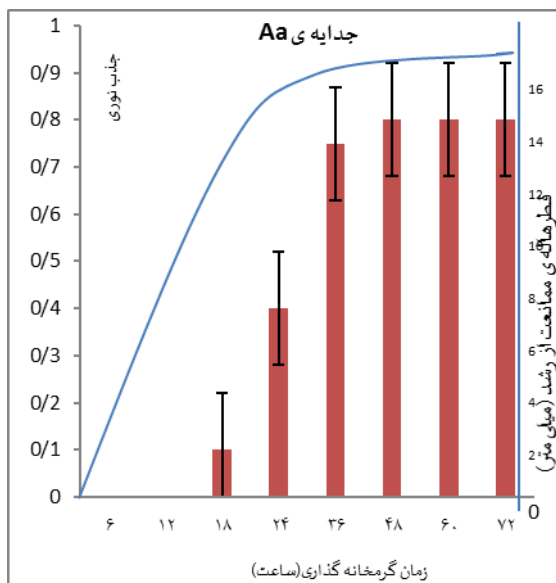
نتایج بدست آمده از این مرحله ی تحقیق نشان داد که تمامی باکتری ها بیشترین متابولیت های ضد میکروبی را در ساعت های ۳۵ تا ۴۸ تولید نمودند. بنابراین می توان

الکتروفورز SDS-PAGE استفاده شد. نتایج تعیین وزن مولکولی پروتئین های استخراج شده مربوط به جدایه Ra در شکل ۳ نمایش داده شده است که با توجه به وزن مولکولی آن وجود لاکتوسین را اثبات کرده است. نتایج الکتروفورز به روش SDS-PAGE برای لاکتوباسیلوس ها ایجاد تک باند پروتئینی با وزن ۴,۵ کیلودالتون را نشان داد که نشانه ی خلوص ماده پروتئینی به دست آمده است.



شکل ۳- لاکتوسین خالص شده از روش SDS-PAGE

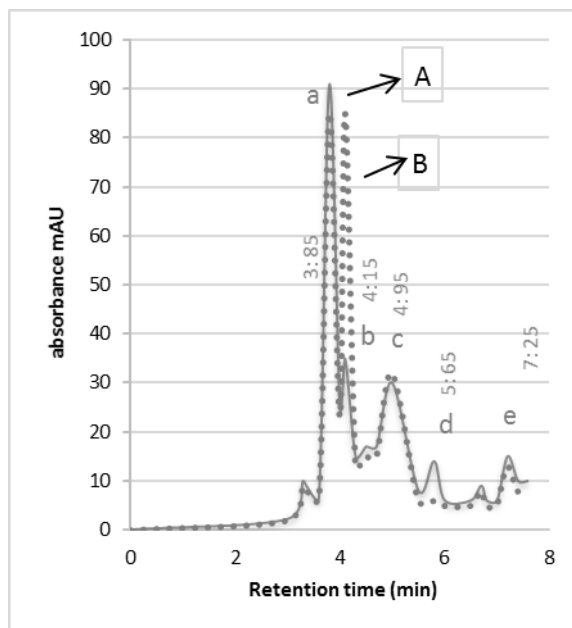
مقایسه ای با اسید های آلی موجود در ترکیبات ضد میکروبی Aa (اسید مالیک، اسید لاکتیک و اسید سیتریک با زمان ماندگاری ۳,۸۵ ، ۴,۸۵ و ۷,۲۴) شبیه هستند. بنابراین این جدایه ترکیب متابولیت ضد میکروبی آن حاوی اسید های آلی بود.



### ۳-۵- خالص سازی و ارزیابی ساختار احتمالی متابولیت های ضد میکروبی با استفاده از HPLC و SDS-PAGE

نتایج خالص سازی ترکیبات فعال زیستی ایجاد شده پس از تیمار با سولفات آمونیوم، تشکیل سه فاز را نشان داد، شامل: فاز سبک رویی (حاوی ترکیبات لیپیدی و سایر مواد سبک موجود در محیط)، فاز آبی (حاوی پروتئین های رسوب داده شده) و فاز رسوبی (حاوی پروتئین ها) بودند. جهت تأیید وزن مولکولی پروتئین فوق از در نمودار ۳ منحنی استاندارد (خط چین) تهیه شده از اسید های آلی خالص نشان داده شده است. بر اساس این منحنی ترتیب خروج اسید های آلی از HPLC بر اساس قطبیت و اندازه اسید مالیک، اسید لاکتیک، اسید استیک و اسید سیتریک است و زمان ماندگاری اسید مالیک، اسید لاکتیک ، اسید استیک و اسید سیتریک به ترتیب ۳,۸۵ ، ۴,۱۵ ، ۴,۹۵ ، ۵,۶۵ و ۷,۲۵ دقیقه است و از نظر

آن با توالی های باکتری های دیگر موجود در پایگاه داده های NCBI مقایسه شدند و بر اساس مشابهت توالی S rRNA ۱۶ باکتری مورد آزمون این تحقیق با توالی باکتری های دیگر گزارش شده مشخص شد که باکتری مربوط به چه گونه ای است. از طرفی لاکتوباسیلوس ها با تولید متابولیت ضد میکروبی سبب کاهش pH محیط می شوند و از رشد بسیاری از باکتری ها ممانعت می کنند. این باکتری ها بدلیل تولید ترکیبات ضد میکروبی می توانند بعنوان ممانعت ضد میکروبی مورد استفاده قرار گیرند. آونهند و همکاران، به این نتیجه رسیدند که ماده ی ضد میکروبی جدا شده از کشت باکتری های لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقابل باکتری های پاتوژن های روده جوجه های گوشتی از جمله اشیریشیا کولای و سالمونلا تیفی، اثر ممانعت کنندگی دارد و تاثیرات ترکیبات ضد میکروبی باکتری های پروبیوتیک روی باکتری های گرم منفی بیشتر از گرم است (Ouweland *et al.*, ۱۹۹۹). در این تحقیق فاز های مختلف چرخه رشد برای جدایه ها اتفاق افتاد. حداکثر تولید ترکیبات فعال زیستی برای بعضی از ایزوله ها (لاکتوباسیلوس رامنوسوس) در فاز لگاریتمی رشد در محیط کشت تخمیری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و مدت زمان ۴۸ ساعت حاصل شد. این نتایج با بررسی نتایج ماریاسی و همکاران که بیشترین تولید ترکیبات فعال زیستی را در فاز لگاریتمی در لاکتوباسیلوس کازئی دانسته، تطابق داشت. باکتری های لاکتیک اسید از قبیل



نمودار ۳- منحنی اسید مالیک، اسید لاکتیک و اسید

سیتریک در جدایه ی Aa با دستگاه HPLC

#### ۴- بحث

در این تحقیق سعی شده از به روز ترین روش ها برای جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی لاکتوباسیل ها استفاده شود. در منابع مختلف برای جداسازی باکتری ها از محیط کشت MRS استفاده شده و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گزارش شده بود (Watanabe *et al.*, ۲۰۰۸). خصوصیات فنوتیپی سویه ها در شناسایی باکتری ها نقش داشت، اما در بسیاری از سویه ها فقط با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی، شناسایی باکتری ممکن نبود. چون تخمیر قند ها در بسیاری از سویه ها دقیقاً مشابه سویه خاصی در کتاب برجی نبود. پس تعیین توالی ۱۶S rRNA و مقایسه توالی

گرین و همکارانش تطابق خیلی نزدیکی داشت که اثبات وجود این ترکیبات فعال زیستی توسط دستگاه HPLC مورد استفاده قرار گرفت. همچنین وجود ترکیبات فعال زیستی از جمله لاکتوسین ها از لاکتوباسیلوس رامنوسوس با استفاده از فرآیند دیالیز و تعیین وزن مولکولی پروتئین آن با SDS-PAGE در حدود ۵ کیلو دالتون اثبات شده و با نظریات لود وویست تطابق داشت. در نهایت، تحقیقات یک سده اخیر نشان داده لاکتوباسیلوس ها و دیگر میکروارگانیسم ها موجب افزایش مقاومت در برابر باکتری ها می شوند و می توانند بخش روده ای را به واسطه تغذیه با کربوهیدرات های ویژه توسعه دهند.

گونه لاکتوباسیلوس فاکتورهای ضد میکروبی و باکتریوسین های متعددی تولید می کنند که شامل لنتی بیوتیک، لاکتوسین، و پروتئین های کوچک و بزرگ می باشد. به علت تولید فاکتورهای ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک ها به عنوان عوامل درمانی و پیش گیری کننده از بیماری های عفونی ایجاد شده با پاتوژن های دهانی، روده ای و ادراری-تناسلی مطرح شده اند (Spinler *et al.*, ۲۰۰۸).

در این تحقیق ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط لاکتوباسیل ها، پروتئین های ضد میکروبی هستند که معمولاً از لاکتوسین (اثبات موجود آن با انجام فرآیند دیالیز و تعیین وزن مولکولی پروتئین آن با SDS-PAGE در حدود ۵ کیلو دالتون)، تشکیل شده اند. نتایج آن توسط لود وویست در سال ۱۹۹۵ به اثبات رسیده که توسط لاکتوباسیلوس رامنوسوس تولید شده است. همچنین در این تحقیق با تولید ترکیبات ضد میکروبی از جمله اسیدهای آلی از لاکتوباسیلوس پلانتاروم و اثر آنتاگونیستی با بازدارندگی پاتوژن های روده با نظریات

#### منابع

- Aroutcheva Alla A, Simoes Jose A, Sebastian Faro. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. Infect Dis Obstet Gynecol 2001; 9: 33–39.

- Ehrmann, M.A., Muller, MRA., Vogel, RF. 2003. Molecular analysis of sourdough reveals *Lactobacillus mindensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 53: 7–13.
- Johanstone, A., Thorpe R. 1987. Specific Detection of Antigens Separated by polyacrylamid gel Electrophoresis, in: Johnstone A., Thorpe R., *Immunochemistry in practice*, Blackwell Scientific Publications, London. p183-198.
- Kandler O, Nobert W. *Bergeys manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. New York. Springer; 1989.
- Kandler, O., Nobert, W. 1989. *Bergeys manual of systemat bacteriology*.
- Lue De Vuyst. Functionality of novel starter cultures intraditional fermentation process. *Microbiol* 1995; 41: 1-7.
- Naderi-Nasab, M., Rashed, T, Nazem 1996. *Laboratorial Bacteriology*. Astan Ghods Razavi publisher, Iran. (In Farsi).
- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr J Biotechnol* 2003; 2(8): 219-227. 18. Hamdan I Y, Mikolajcik E M. Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J Antibiot* 1974; 27:631-636.
- Padmanabha Reddy V, Christopher MD, Sankara Reddy I. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Tamilnadu J Vet Animal Sci* 2006; 2(4): 142-144. Hardie, J.M. 1986. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (eds. Sneath, P.H.A., Mair,
- Pourahmad, R., and Assadi, M. M. 2007. Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. *International Journal of Dairy Technology*. 60: 259-262.
- Servin AL. Antagonist activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 2004. 28:428-460.
- Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. *Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens*. *Anaerobe*. 2008; 14: 166-171.
- Strus M, Pakosz K, Gosciniak H, Przondo Mordarska A. Antagonistic activity tract pathogens (*Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Closteridium difficile* ). *Med Diew Microbiol* 2001; 53 (2): 133-142.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T., & Demberel, S. 2008. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional

fermented milk products of Mongolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 13-25.

- Williams W (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore, 2: 1209-1235.