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

جمالی، فاطمه[۱]. باصری صالحی، مجید[۲]، بهادر، نیما[۳]

[۱] دانشجوی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه میکروبیولوژی.

[۲] عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، گروه میکروبیولوژی.

[۳] 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 از۵۰ 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 ها ی 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 آسپرجیلوس 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.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس ها، متابولیت های ضد میکروبی، HPLC و SDS-PAGE.

۱. مقدمه

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 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 ضدمیکروبی هستند که معمولا از رشد باکتری های گرم مثبت جلوگیری می کنند (Lue De Vuyst, 1995). درحالی که ترکیبات تولید شده با جرم مولکولی کم، مثل اسید لا تیک، رشد پاتوژن های گرم منفی را مهار می کنند(Aroutcheva *et al.*, 2001). فعالیت ضدمیکروبی اکثر لاکتوباسیل ها به علت تولید اسید لاکتیک است، اما مواد ضدمیکروبی دیگر نظیر ترکیبات آروماتیک و مولکول های هتروسیکلیک و موالونولاکتون 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

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 $۱۰^{-۷}$ انجام گرفت. سپس از رقت های مختلف ۱/. میلی لیترسوسپانسیون برداشته و بر روی محیط کشت MRS جامد به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآئروفیل 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 ۴۸ساعته ی این باکتری ها استفاده شد. ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون کشت جدایه ها به طور جداگانه برداشت شده و در دور ۸۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. متعاقب این عمل محیط کشت مولر هینتون تهیه گردید و باکتری های اشرشیاکولی, استافیلوکوکوس اوروئوس, سالمونلا تایفی موریوم, سودوموناس آئروجینوزا و قارچ های آسپرجیلوس 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 ماکرولیتر 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 سیلسیوس 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 ۳۷°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 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGG CTCAG-3') و 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') جهت تکثیر این قطعه ژنی استفاده شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم واکنش 25 µl شامل مخلوط 1X Taq Master، 1.5 mM MgCl2، 0.25 mM پرایمر فوروارد، 0.25 mM پرایمر ریوارس و 0.4 ng ژنوم DNA انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت ۳ دقیقه در°C ۹۵ و با انجام ۴۰ سیکل متوالی در ۹۵°C در مدت ۳۰s، ۵۵°C به مدت ۵۰s، ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در و در پایان ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه به اتمام رسید. الگوی باندی 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 GenRuller SM) مورد استفاده قرار گرفت و عکس برداری توسط دستگاه ژلداک (UVP، امریکا) انجام شد(Ehrmann *et al*., ۲۰۰۳). برای شناسایی توالی های ۱۶S rRNA ایزوله های مورد مطالعه، از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST استفاده شد. جهت آنالیز توالی ژن ۱۶S rRNA سویه های مورد بررسی، توالی‌های این ژن در پایگاه Genebank با توالی بدست آمده مورد مقایسه قرار گرفت(Ehrmann *et al*., 2003).

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 دمای۳۷ درجه ی سلسیوس، در شرایط میکروآئروفیل 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 ۵۶۰nm توسط اسپکتروفوتومترخوانده شد و آنالیز آماری صورت گرفت و پس از آن نمونه ها در دورrpm ۸۵۰۰ 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 اوروئوس, سالمونلا تایفی موریوم, سودوموناس ایروجینوزا و قارچ های آسپرجیلوس 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 ماکرولیتر 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 سیلسیوس 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 لاکتو باسیلوس 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 ۱ساعت 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 ۱میلی لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۰۵(pH=7) مخلوط گردید. پس از آن کیسه های دیالیز ۱۲۰۰KD 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 ۲۰۰میلی لیتر فسفات ۵ درصد (pH=7) قرار داده شدند وبه مدت ۴۸ در دمای ۴درجه 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 ماکرولیتر 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 موجوددر نمونه ها از وزن مولکولی آنها استفاده می گردد. در این روش از الکتروفورزبا استفاده از ژل آکریل آمید ۱۵ درصد با سیستم ناپیوسته تحت شرایط دناتوره 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(اتانول + 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 ۰/۴۵μm 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 ۴۰ml) 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 نظراستفاده 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*).

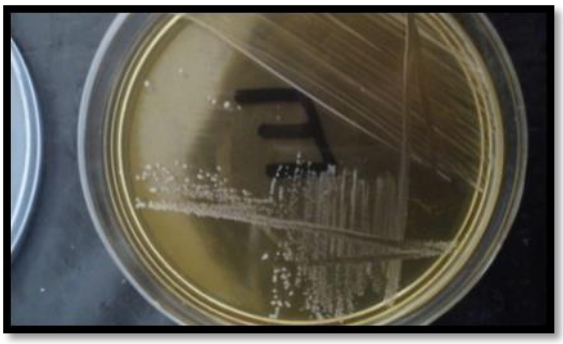
۲-۷- روش آنالیز آماری

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.

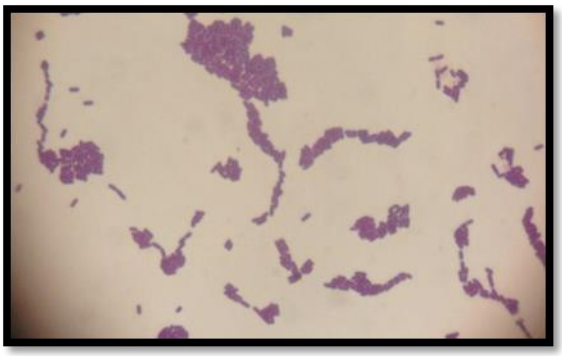
۳- نتایج

۳-۱- جداسازی و شناسایی فنوتیپی لاکتوباسیلوس ها

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 میکروسکپی 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.



شکل ۱- مشخصات ماکروسکپی لاکتوباسیلوس ها



شکل ۲- مشخصات میکروسکوپی لاکتوباسیلوس ها

جدول ۱- شناسایی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده بیوشیمیایی به وسیله آزمون های بیوشیمیایی

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

تولید اسید از:		
آرابینوز	+	V
اسکولین	+	+
ریبوز	+	+
گلوکز	+	+
لاکتوز	V	+
مانوز	+	+
مانیتول	+	+
مالتوز	+	+
رافینوز	–	-
سوربیتول	+	–
سوکروز	V	+
زیلوز	+	+
ملی زیتوز	V	V
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 ۱۰سویه لاکتوباسیلوس جدا شده ۲ جدایه قادر به تولید متابولیت ضد میکروبی قوی تری بودند. همان گونه که در **جدول ۲** نشان داده شده است, متابولیت ضد میکروبی تولیدی توسط جدایه ها بر باکتری های، سودوموناس ائروجینوزا، استافیلوکوکوس ارئوس, سالمونلا تایفی موریوم, اشرشیا کولی و قارچ های آسپرجیلوس 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 آسپرجیلوس نیجر دارای بیشترین حساسیت بودند.

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

پاتوژن های بیماری زا	ممانعت ضد میکروبی توسط جدایه ها (بر حسب میلیمتر)	
	Ra	Aa
آسپرجیلوس نیجر	۱۴±۱	۱۳±۱
سودوموناس ائروجینوزا	۱۵±۱۱	۱۳±۱
استافیلوکوکوس.ارئوس	۱۸±۱	۱۵±۱
سالمونلاتایفی موریوم	۱۶±۱	۱۳±۱
اشریشیا کولی	۱۷±۱	۱۶±۱
کاندیدا آلبیکنس	۱۵±۱	۱۲±۱

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

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.

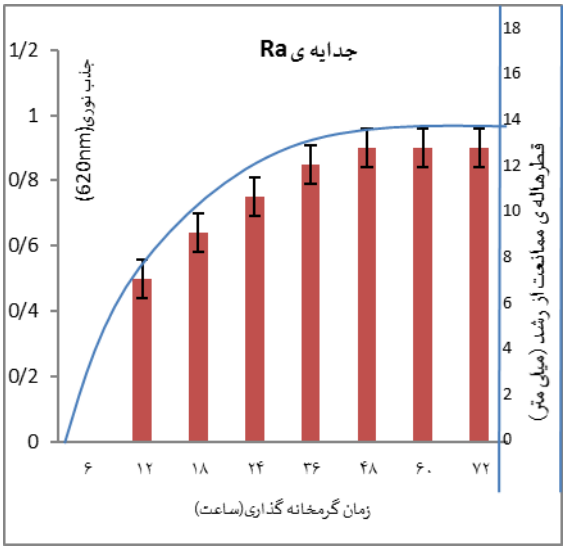
جدول ۳- شناسایی لاکتوباسیلوس ها توسط 16S rRNA sequencing

جدایه ها	Aa	Ra
شناسایی بیوشیمیایی	لاکتو.پلانتاروم	لاکتو. رامنوسوس
16S rRNA identification	لاکتو.پلانتاروم *DSM 20205*	لاکتو. رامنوسوس *JCM 1136*
قرابت نزدیکی	ACGZ01000098	D16552
شناسایی(%)	٪۹۹/۹	٪۹۹/۸

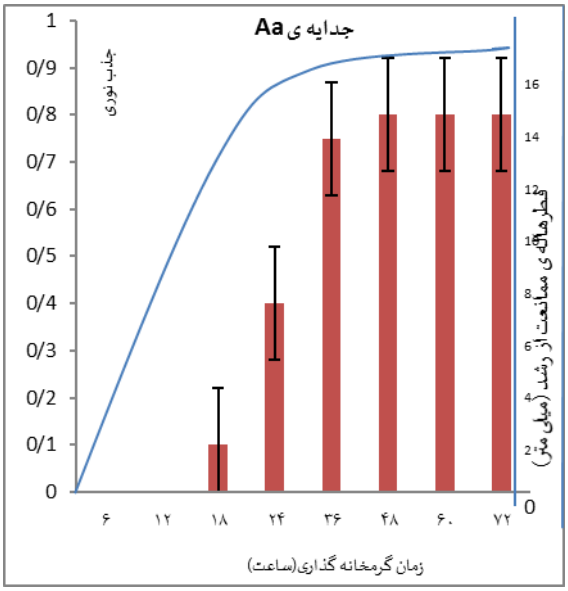
۳-۴- ارزیابی تولید متابولیت های ضد میکروبی در فازهای رشد

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 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

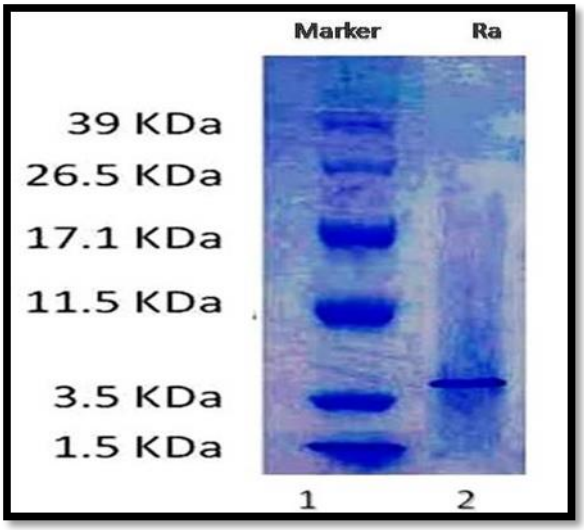


نمودار ۲- تولید متابولیت ضد میکروبی در فازهای مختلف رشد جدایه ی Aa



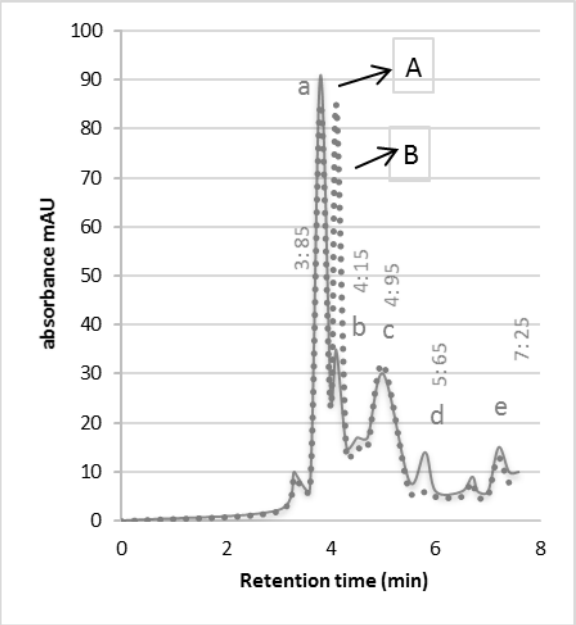
۳-۵- خالص سازی و ارزیابی ساختار احتمالی متابولیت های ضد میکروبی با استفاده از HPLC و SDS-PAGE

نتایج خالص سازی ترکیبات فعال زیستی ایجاد شده پس از تیمار با سولفات آمونیوم، تشکیل سه فا ز 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 تائید 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 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.



شکل۳- 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.



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 دقیقا مشابه سویه خاصی در کتاب برجی نبود. پس تعیین توالیS ۱۶ rRNA و مقایسه توالی آن با توالی های باکتری های دیگر موجود در پایگاه داده های NCBI مقایسه شدند و بر اساس مشابهت توالی S ۱۶rRNA 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. آونهاند 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 اشریشیا 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 (Ouwehand *et al.*, ۱۹۹۹). در این تحقیق فاز های مختلف چرخه رشد برای جدایه ها اتفاق افتاد. حداکثر تولیدترکیبات 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

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 ضدمیکروبی هستند که معمولا 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 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.

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 mannual of systematic bacteriology, 2nd ed. New York. Springer; 1989.
- Kandler, O., Nobert, W. 1989. Bergeys mannual 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, Goscinia H, Przondo Mordarska A. Antagonistic activity tract pathogens (Helicobacter pylori, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Closteridium difficle*). 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.

.