# جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک از دستگاه گوارش زنبور عسل در استان مرکزی

نیلوفر سلیمانی ۱، محسن زرگر۲ *، پروانه جعفری ۳

۱ دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران،

۲ عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران ،

۳ عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران ،

چکیده

زنبور عسل حشره ای مفید است که در طبیعت به واسطه گرده افشانی نقش مهمی دارد. دستگاه گوارش زنبور عسل دارای میکروارگانیسم های همزیست است. تحقیقات اخیر نشان داده میکروارگانیسم هایی مفید در زنبور عسل شناخته شده اند که در فعل و انفعالات بدن زنبور عسل شرکت دارند. استفاده از مکمل های پروبیوتیک در صنعت زنبورداری سبب افزایش سرعت رشد و بهبود ضریب تبدیل خوراک و بهبود مقاومت در مقابل بیماری و افزایش تولید عسل می شود. هدف از این پژوهش جداسازی باکتری های مفید دستگاه گوارش زنبور عسل در چند منطقه از استان مرکزی و بررسی شاخص های پروبیوتیکی جدایه ها است .

بر این اساس نمونه های زنبور عسل کارگر سالم از زنبورستان ها جداسازی و به آزمایشگاه جهت جداسازی دستگاه گوارش انتقال یافت .نمونه ها در محیط MRS براث در شرایط بی هوازی گرماگذاری و غنی سازی شدند. کلنی های کاتالاز منفی و همولایز منفی مورد آزمون تشخیص فیلوژنی قرار گرفتند .از مجموع باکتر یها یک جدایه لاکتوباسیل مورد آزمون شناسایی فیلوژنی قرار گرفت که از گونه لاکتوباسیلوس فارسیمینس بود. نتایج مطالعه حاضر بیانگر حضور باکتری های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش زنبور عسل است.

کلمات کلیدی: زنبور عسل ،لاکتوباسیلوس فارسیمینس، پروبیوتیک

مقدمه

پروبیوتیک عبارت است از مکمل میکروبی که از طریق متعادل سازی میکروب های بومی طبیعی روده اثرات مفید بر بدن میزبان اعمال می کند)کارتریس و همکاران،۱۹۹۱(. بسیاری از گونه های پروبیوتیک به گروه بزرگی از باکتری ها به نام باکتری های اسیدلاکتیک تعلق دارند. این باکتری ها میکروب های بومی بدن انسان و دام بوده، اما به طور طبیعی در گیاهان نیز وجود دارند.

پروبیوتیک ها تنها به عنوان ترکیب غذایی خورده نمی شود، بلکه از زمانی که واژه پروبیوتیک در دهه ۱۹۹۱ توسط کولاد ابداع شده، لی لیی و استیلول در سال ۱۹۹۹ این واژه را برای باکتری های زنده و اسپورها به عنوان مکمل غذایی حیوانی به کار بردند که باید به بهبود استفاده از آنتی بیوتیک ها در محیط حیوانی کمک می کرد)کولاد۱۹۹۳؛ استیلول،۱۹۹۹(. باکتری های اسید لاکتیک، گرم مثبت، میله ای و کوکسی شکل بدون اسپور هستند، مقاوم به هوا یا بی هوازی، اسیدوفیلیک یا اسیدوریک می باشند.

این باکتری ها در انواع متنوعی از زیستگاه ها وجود دارند که دارای سوبستراهای کربوهیدرات ها مثل غشاهای موکوسی انسانی و حیوانی یا گیاهی و ماده با منشاء گیاهی هستند)روتر،۱۹۹۱(. ماهش و همکارانش در سال ۲۱۱۲ بیان کردند میکروارگانیسم های موجود در روده حشرات نقش مهمی را در تغذیه حشرات دارند. لاکتوباسیل برای ترمیم اکوسیستم میکروبی روده نقش مهمی دارد به این خاطر ترویج خواص گونه های لاکتوباسیلوس به طور گسترده ای به عنوان پروبیوتیک استفاده می شود)پاتاب هیراما و همکاران،۲۱۱۲( آندرسون و همکارانش در سال ۲۱۱۳ اکولوژی میکروبی را در کندوی زنبور عسل مورد بررسی قرار دادند. تقریباً تمام یوکاریوت ها میزبان باکتری های مفید در لومن روده ای خود هستند که این ها را یا به ارث می برند یا از محیط زیست دریافت می کنند. بنابراین شناسایی فنوتیپ های باکتری های مفید در زنبور عسل و کندو امری مهم است. نتایج نشان داد درجه حرارت، رطوبت، پتانسیل اسمزی محیط و pH شهد گل بر مجموعه باکتریایی روده زنبور عسل تاثیرگذار است)آندرسون و همکارن،۲۱۱۳(. کلادو و همکارانش در سال ۲۱۱۲ اکولوژی میکروبی و نقش میکروبیوتاها را در زندگی جانوران مطالعه کردند.

فعالیت میکروبیوتاها در فیزیولوژی و رشد نقش مهمی دارد. شواهد نشان داده استفاده از پروبیوتیک ها در پیشگیری و درمان بیماری آتوپیک، اختلالات سیستم ایمنی، چاقی و دیابت موثر است) کلادو و همکاران، ۲۱۱۲(. هدف از این پژوهش جداسازی باکتری های مفید دستگاه گوارش زنبور عسل در چند منطقه از استان مرکزی و بررسی شاخص های پروبیوتیکی جدایه ها می باشد.

مواد و روش ها

نمونه های زنبور عسل کارگر سالم در تابستان، پاییز و اواخر زمستان ۱۳۹۳ از زنبورستان های استان مرکزی جمع آوری شدند. نمونه ها با ایجاد شرایط مساعد هوارسانی به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی اراک انتقال داده شدند. دستگاه گوارش زنبور های عسل جداسازی . جهت غنی سازی و رشد لاکتوباسیل ها به محیط MRSمایع)مرک آلمان( منتقل شدند. نمونه ها برای ۳ تا ۴ روز در دمای ۳۱ درجه سانتیگراد و در انکوباتور ۹٪ $CO_2$ دار کشت داده شدند .۹ کلنی با مورفولوژی متفاوت جداسازی ، شناسایی و کشت ایزوله انجام شد. آزمون رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز به عنوان غربالگری اولیه لاکتوباسیل ها انجام شد. همچنین سویه های جداسازی شده جهت تست همولایز در محیط کشت MRS آگار حاوی ۸٪ خون گوسفندی کشت داده شدند. باسیل های گرم مثبت

، کاتالاز منفی و همولایز منفی انتخاب شدند. نمونه های جداشده جهت ذخیره سازی درMRS مایع ۲۱ درصد گلیسرول در دمای C۲۱ º- کشت و نگهداری شد) تاج آبادی و همکاران ،۲۱۱۳(.

جهت بررسی توان پروبیوتیک جدایه ها تحمل شرایط اسیدی به مدت ۲ تا ۴ ساعت در محلول نرمال سالین حاوی HCl با pH ۲ و ۴ و سپس تهیه رقت های متوالی در دوسری شمارش انجام شد.

جهت سنجش تحمل جدایه های لاکتوباسیلی بدست آمده نسبت به صفرا از محیط MRS مایع حاوی ۱/۳٪ نمک سدیم اگزالات استفاده و ضریب بازدارندگی در زمان صفر تا هشت ساعت محاسبه شد)مورلی و همکاران ،۲۱۱۱(.

مطابق با پروتکل کیت استخراج DNA سیناکلون ،DNA استخراج شد .۲ میلی لیتر سوسپانسوین باکتری را در میکروتیوب اضافه شده و برای ۹ دقیقه با دور rpm ۴۱۱ سانتریفیوژ شد. به رسوب باکتری ۱۱۱ میکرولیتر آنزیم پری لایزیز و ریبوتیناز اضافه و برای ۳۱ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. سپس ۳۱۱ میکرولیتر بافر رسوب دهنده به میکروتیوب اضافه کرده و برای ۹ ثانیه ورتکس شدید انجام شد، نمونه حاضرrpm ۱۳۱۱ برای ۱ دقیقه سانتریفیوژکرده و نمونه DNA استخراج شده مورد آزمون های بعدی قرار گرفت. در مطالعه حاضر از پرایمر اول )27F(´5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´( پرایمر دوم )1492R(

)´5´GTTACCTTGTTACGACTT3´( استفاده شد .واکنش های زنجیره ای پرایمری با PCR انجام شد و در نهایت محصول PCR مورد بررسی قرار گرفت و در ژل آگارز با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با کیت تخلیص سازی و جهت تعیین توالی زنی S rRNA16 به شرکت بیونر کره جنوبی ارسال و سکانس ها با نرم افزار Finch TV و MEGA4 خوانده شدند.

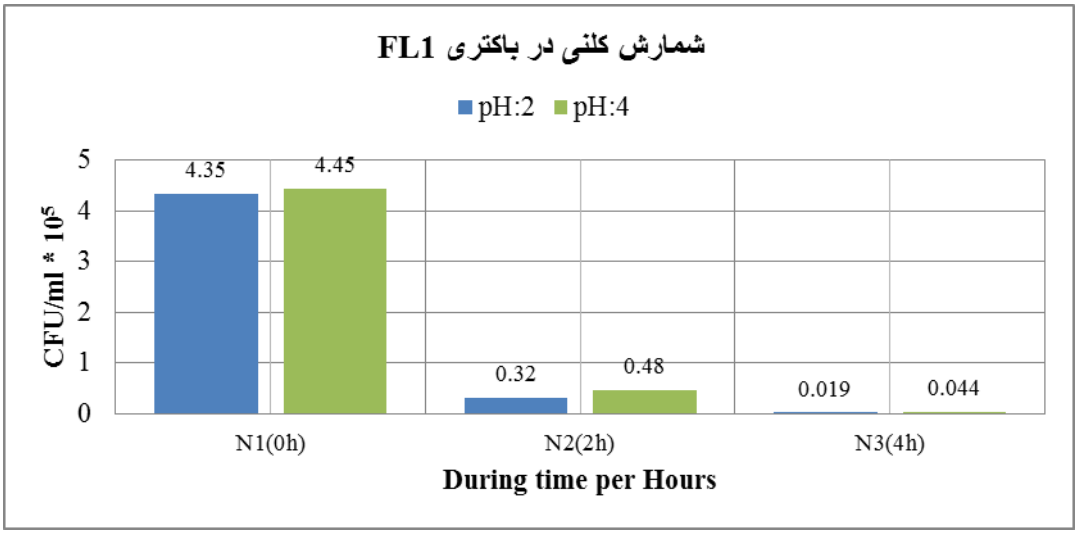
نتایج

از مجموع باکتریهای جداسازی شده یک باکتری باسیل کوتاه گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان لاکتوباسیل شناسایی و معرفی گردید. جهت تایید توان پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیل مورد بررسی تحمل اسید HCl با pH ۲ و ۴ قرار گرفت. شمارش دوسری نمونه باکتری در زمان صفر در pH ها به ترتیب دارای $35.4 \times 10^5$ cfu/ml و $45.4 \times 10^5$ cfu/ml بود. پس از گذشت ۲ ساعت مجدد شمارش باکتری در pHها مورد بررسی قرار گرفت که دارای $32.0 \times 10^5$ cfu/ml و $48.0 \times 10^5$ cfu/ml بود ،در نهایت شمارش باکتری در ۴ ساعت پس از تلقیح به ترتیب $019.0 \times 10^5$ cfu/ml و $044.0 \times 10^5$ cfu/ml بود. نتایج بیانگر آن است که باکتری شرایط اسیدی pH ۴ را در زمان ۲ ساعته میتواند تحمل کند و به حداقل استاندارد شمارش کلنی نزدیک باشد. همچنین باکتری جهت بررسی میزان تحمل نمک صفراوی در زمان صفر تا هشت ساعت در غلظت های ۱/۱۹ ٪ ، ۱/۳ ٪ ، ۱/۴۹ ٪ از نمک

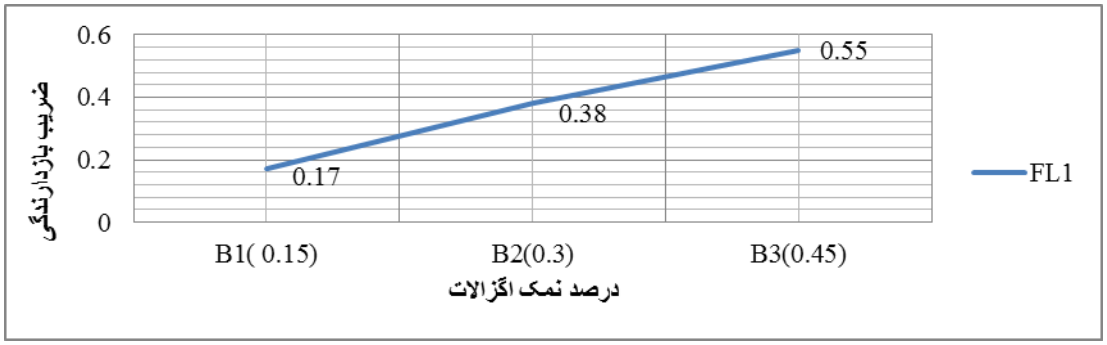
سدیم اگزالات با جذب نوری $OD_{600}$ به ترتیب دارای شریب بازدارندگی ۱/۱۱، ۱/۳۸، ۱/۹۹ بود که شرایط بهینه برای باکتری های پروبیوتیک ضریب کمتر از ۱/۴ می باشد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که دستگاه گوارش زنبور عسل می تواند دارای ۱ فیلوتایپ مختلف از لاکتوباسیل باشد. باکتری با کد)[1] $FL_1$( ۹۸٪ مشابه لاکتوباسیلوس فارسیمینس بوده است که با نام های )Query-19897( در دندروگرام فیلوژنتیکی تعریف گردید. نتایج حاصل از مطالعات نشان داد؛ در حال حاضر در معده زنبوران عسل در استان مرکزی باکتری هایی با جنس لاکتوباسیلوس قابل شناسایی است) نمودار ۳(.

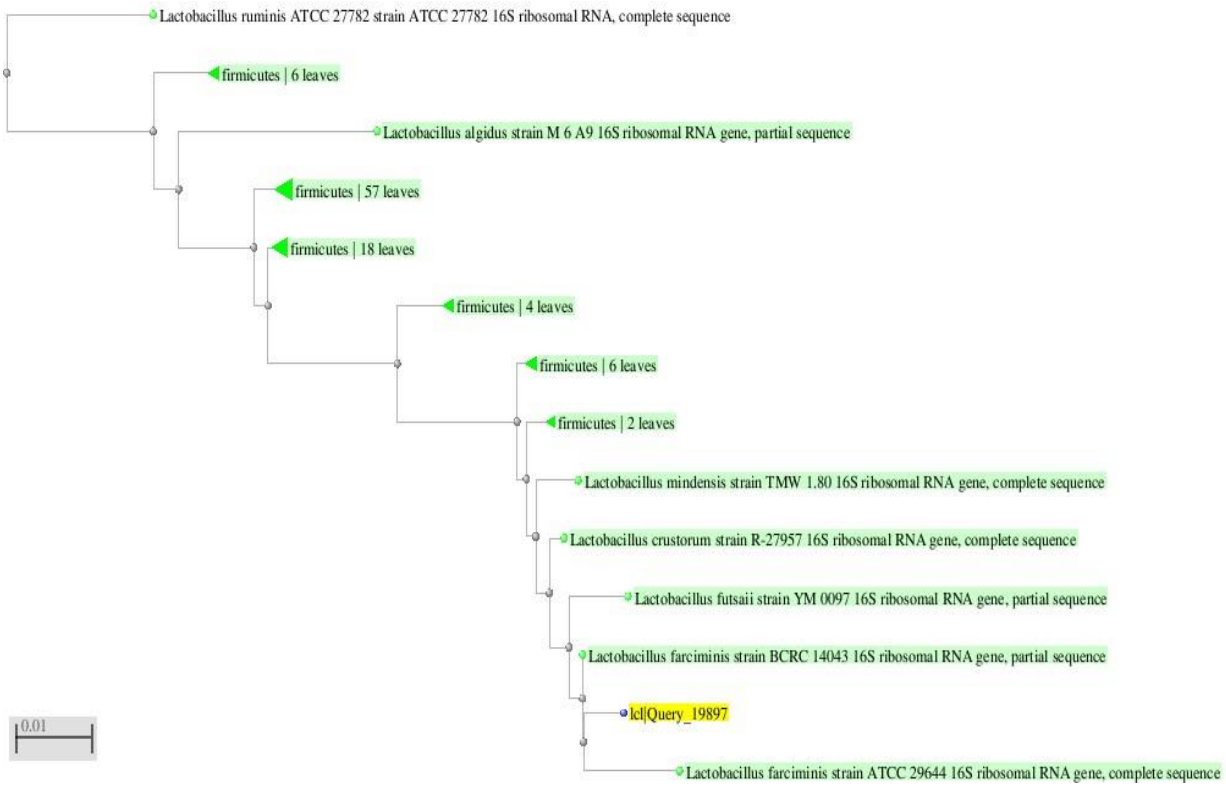
[1] Farmahin-Lactobacillus




نمودار۱- شمارش کلنی های مقاوم به اسید در بازه زمانی و تغییرات pH




نمودار۲- تغییرات ضریب بازدارندگی نمک سدیم اگزالات در باکتری $_1$FL




نمودار۳- دندروگرام فیلوژنتیکی نمونه FL )Query_19897[1](

بحث و نتیجه گیری

مطالعات انجام شده بر جداسازی لاکتوباسیل های دستگاه گوارش زنبور عسل انجام گردید .باکتری های اسید لاکتیک شناسایی شده به عنوان باکتری های پروبیوتیک انسانی و حیوانی اهمیت دارند. بنابراین تحقیقات در مورد حضور غالب لاکتوباسیل ها در دستگاه گوارش زنبور عسل جهت بهبود ایمنی و سلامت زنبور و همچنین تولید محصول عسل حاوی پروبیوتیک حائز اهمیت است.

در مطالعه حاضر، تغییرات و شرایط آب و هوایی می تواند بر تنوع میکروارگانیسم های دستگاه گوارش حشرات از جمله زنبور عسل مؤثر باشد، هورانکوا و همکارانش در سال ۲۱۱۹ تنوع میکروبی روده زنبور عسل را با توجه به شرایط زمانی و جغرافیایی مورد مطالعه قرار دادند نتایج نشان داد میکروبیوتاهای جداسازی شده عمدتاً از گروه باکتری های گرم مثبت [۲] هستند که با نتایج آنالیز فیلوژنی

[2] Firimicute

در این تحقیق مشابه است ) هورانکوا و همکاران ،۲۱۱۹(. جوامع باکتریایی در زنبور عسل با توجه به گرده افشانی در گیاهان متفاوت است، همچنین ممکن است آلودگی هایی از این طریق به زنبور منتقل شود. باکتری های پاتوژن فرصت طلب در دستگاه گوارش زنبور عسل و گرده ها اسینتوباکتر ها هستند، این باکتری در آب و خاک وجود دارد. گرشتین و همکارانش در سال ۲۱۱۳ جوامع باکتریایی را در زنبور عسل و گرده در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند، نتایج نشان داد ترکیبات جوامع باکتریایی در هر زنبور عسل منحصر به فرد است)گرشتین و همکاران،۲۱۱۳(. در مطالعه حاضر، سویه های ایزوله شده از کیسه عسل زنبور ها با روش شناسایی 16S rRNA مورد مطالعه قرار گرفت، نتایج نشان داد، سویه جداسازی شده با روش رسم درخت فیلوژنتیکی از جنس لاکتوباسیلوس ها است، و ۹۸٪ به سویه لاکتوباسیلوس فارسیمینس شباهت دارد. کیلر و همکارانش در سال ۲۱۱۴، از دستگاه گوارش زنبور عسل در شرایط آزمایشگاهی لاکتوباسیلوس بومبی[3] را با شباهت ۸۱٪ به لاکتوباسیلوس آلیمنتاریوس DSM 20249 جداسازی کردند، که با نتایج جداسازی لاکتو باسیل ها در این تحقیق میتواند مشابه باشد)کیلر و همکاران،۲۱۱۴(. لاکتوباسیل ها طیف گسترده ای در زیستگاه ها و دستگاه گوارش حیوانات از جمله زنبور عسل دارند. وجود میکروارگانیسم های اسیدلاکتیک در عسل موجب پایین بودن pH و اثر ضدمیکروبی آن می شود. تجزیه و تحلیل نشان داد که کیسه عسل زنبورهای عسل میتواند دارای فیلوتایپ مختلف از لاکتوباسیل ها باشد، تاج آبادی و همکارانش در سال ۲۱۱۳ لاکتوباسیلوس پلانتاریوم،

لاکتوباسیلوس پنتوسوس و لاکتوباسیلوس فرمنتوم را از کیسه عسل زنبورعسل در مالزی جداسازی و شناسایی کردند)تاج آبادی و همکاران ،۲۱۱۳(. در مطالعه حاضر، جدایه اسید لاکتیک از کیسه عسل مورد بررسی مقاومت و پایداری در شرایط اسیدی و نمک صفراوی قرار گرفت. از مجموع باکتری ها سویه لاکتوباسیلوس فارسیمینس نسبت به شرایط اسیدی نیمه حساس و نسبت به شرایط قلیایی نمک صفراوی پایدار بود. نریمانی و همکارانش در سال ۱۳۹۴ تحمل اسیدیته و مقاومت به نمک صفراوی را بر لاکتوباسیلوس های جداشده از شیر در شهرستان خوی مورد بررسی قراردادند. نتایج نشان داد سویه های باکتریایی اسید لاکتیک در شرایط اسیدی )۲/۹، ۴( pH دارای پایداری نیمه حساس تا مقاوم هستند. همچنین نمونه های غربالگری شده از شرایط اسیدی دارای مقاومت به نمک صفراوی )۱/۳ ٪( بودند. این نتایج با نتایج تحقیق حاضر همسو می باشد) نریمانی و همکاران،۱۳۹۴(.

عادت تغذیه یکی از قوی ترین عوامل مؤثر در فلور حشرات است. تفاوت در منبع شهد در جنس باکتریایی و فلور معده زنبور عسل تأثیر دارد. همچنین فعالیت زنبوران عسل در کندو می تواند در لاکتوباسیل ها و سویه های باکتریایی دستگاه گوارش آنها اثر داشته باشد) تاج آبادی و همکاران ،۲۱۱۱(. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد لاکتوباسیلوس های جدید در دستگاه گوارش زنبور های

[3] *Lactobacillus bombi*

عسل در استان مرکزی با فلوتایپ جدید و نزدیک به  لاکتوباسیلوس فارسیمینس در گروهی از جنس لاکتوباسیل ها قرار گرفت که این تفاوت با بررسی 16SrRNAمورد مطالعه قرار گرفت . تقدیر و تشکر:

مولفین بر خود واجب می دانند تا از امکانات قرار گرفته توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد های قم و اراک برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

نریمانی, ط., نژاد, ع. ت ., حجازی, م. ا)۱۳۹۴(. جداسازی و شناسایی بیوشیمایی و مولکولی باکتری های لاکتوباسیلوس باا پتانسیل پروبیوتیکی از شیر گاو و ماست سنتی شهر خوی. علوم و صنایع غذایی ,۱۲, ۱۱۹-۱۲۸

ANDERSON, K. E., SHEEHAN, T. H., MOTT, B. M., MAES, P., SNYDER, L., SCHWAN, M. R., WALTON, A., JONES, B. M. & CORBY-HARRIS, V. 2013. Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (Apis mellifera).

CHARTERIS, W. P., KELLY, P. M., MORELLI, L. & COLLINS, J. K.(1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in mixed bacterial populations. International journal of food microbiology, 35, 1-27.

COLLADO, M. C., CERNADA, M., BAUERL, C., VENTO, M. & PEREZ-MARTíNEZ, G. 2012. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. Gut microbes, 3, 352-.563

GENERSCH, E(2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 87-.79

HRONCOVA, Z., HAVLIK, J., KILLER, J., DOSKOCIL, I., TYL, J., KAMLER, M., TITERA, D., HAKL, J., MRAZEK, J. & BUNESOVA, V(2015). Variation in Honey Bee Gut Microbial Diversity Affected by Ontogenetic Stage, Age and Geographic Location. PloS one, 10, e0118707.

KILLER, J., VOTAVOVA, A., VALTEROVA, I., VLKOVA, E., RADA, V. & HRONCOVA, Z(2014). Lactobacillus bombi sp. nov., from the digestive tract of laboratoryreared bumblebee

queens (Bombus terrestris). International journal of systematic and evolutionary microbiology, 64, 2611-2617.

KOLLATH, W(1953). [The increase of the diseases of civilization and their prevention.]. Munchener medizinische Wochenschrift (1950), 95, 1260-1262.

LILLY, D. M. & STILLWELL, R. H(1965). Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. Science, 147, 747-748.

MORELLI, L)2007(. In vitro assessment of probiotic bacteria: from survival to functionality. International Dairy Journal, 17, 1278-1283.

PATTABHIRAMAIAH, M., REDDY, M. & BRUECKNER, D. 2012. Detection of novel probiotic bacterium Lactobacillus spp. in the workers of Indian honeybee, Apis cerana indica. International Journal of Environmental Sciences, 2, 1134-.3411

REUTER, G)1997(. Present and future of probiotics in Germany and in Central Europe. Bioscience and microflora, 16, 43-51.

TAJABADI, N., MARDAN, M., MANAP, M. Y. A. & MUSTAFA, S)2013a(. Molecular identification of Lactobacillus spp. Isolated from the honey comb of the honey bee (apis dorsata) by 16s rrna gene sequencing. Journal of Apicultural Research, 52, 235-241.

TAJABADI, N., MARDAN, M., SAARI, N., MUSTAFA, S., BAHREINI, R. & MANAP, M. Y. A)2013b(. Identification of Lactobacillus plantarum, Lactobacillus pentosus and Lactobacillus fermentum from honey stomach of honeybee. Brazilian Journal of Microbiology, 44, 717-.227

TAJABADI, N., MARDAN, M., MANAP, M. Y. A., SHUHAIMI, M., MEIMANDIPOUR, A. & NATEGHI, L)2011(. Detection and identification of Lactobacillus bacteria found in the honey stomach of the giant honeybee Apis dorsata. Apidologie, 42, 642.946

**Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Gastrointestinal System of Honeybee in Markazi Province**

**Abstract:**

Honeybee is a useful insect who plays a critical role due to pollination. Gastrointestinal system of honeybee has coexistent microorganisms. The recent researches showed that the useful microorganisms in honeybee are recognized to participate in the interactions of honeybee body. Using probiotic supplements in apiculture industry will increase the speed of growth, improve coefficient of food transformation, improve the resistance to disease and increase the honey production. The purpose of this research is to separate the useful bacteria of gastrointestinal system of honeybee in several districts of Markazi Province and study the probiotic indices of samples. Accordingly, the samples of healthy worker bees were separated from apiaries and carried to the laboratory for separation of gastrointestinal system. They were heated and enriched in MRS broth under anaerobic condition. Colonies of negative catalysis and hemolysis were analyzed by phylogenic diagnosis test. One lactobacillus was tested for the phylogenic identification which was *lactobacillus farciminis*. The results of this research indicated that presence of lactic acid bacteria in gastrointestinal system of honeybee.

Keywords: Honey bee, Lactobacillus farciminis, Probiotic