

جداسازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از نمونه های ماست شهرستان شهر بابک و شناسایی
ملکولی آن

معین ایزدی¹، محمدحسن فولادی²، غلامرضا شریفی سیرچی^{3*}، جاوید امینی⁴

¹ دانشجوی کارشناسی ارشد، بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

² دانشیار بخش صنایع فرآورده های غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

³ استادیار بخش بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران

⁴ کارشناس ارشد، بخش میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی کرمان، ایران

تاریخ دریافت: 1389/07/20، تاریخ پذیرش: 1390/06/27

چکیده

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) یکی از مفیدترین گونه های لاکتوباسیلوس می باشد که به عنوان یک میکرواورگانیزم پروبیوتیک در محصولات لبنی مانند ماست، شیر و بخش هایی از دستگاه گوارش پستانداران نظیر روده انسان دیده می شود. در این تحقیق سویه های بومی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از 20 نمونه از ماست های منطقه شهر بابک کرمان جداسازی گردید. به منظور شناسایی این باکتری از روش های غیر ملکولی شامل بررسی رشد در دماهای مختلف، بررسی حساسیت یا مقاومت به دیسک های آنتی بیوتیک و بررسی رفتارهای رشدی نسبت به تخمیر قندها، به همراه روش ملکولی تکثیر توالی جزئی ژن 16S rRNA استفاده گردید. با استفاده از این آزمایشات 12 جدایه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس خالص سازی گردید که نتایج بدست آمده از آنها با خصوصیات ذکر شده در کتاب باکتری شناسی سیستماتیک روش های برگگی و نمونه شاهد مثبت مطابقت داشت. این اولین گزارش کشوری از جداسازی جدایه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از ماست های بومی شهر بابک کرمان می باشد. **کلمات کلیدی:** لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، گرم مثبت، هموفرمتاتیو، 16S rRNA.

مقدمه

باکتریایی اسیدوفیلوس می‌توان از روش ملکولی همچون روش RAPD-PCR،¹ DGGE و تکثیر ژن RNA ریبوزمی استفاده کرد. در تحقیقی Kefili et al (2010) با استفاده از دو روش RAPD-PCR و DGGE تغییرات جمعیتی لاکتوباسیلوس های پنیر سنتی لیقوان را بررسی نمودند. مقایسه توالی‌های ژنی گونه‌های باکتریایی نشان داده است که ژن 16S rRNA، بین انواع گونه‌های باکتریایی محصولات لبنی حفظ شده و دارای منطقه متنوعی از V1-V3 بوده که به منظور شناسایی باکتری در سطح گونه بکار می‌رود (Denis et al., 2002). با توجه به این که درون مشک‌های مورد استفاده در روستاهای منطقه شهر بابک که به منظور تولید ماست محلی مورد استفاده قرار می‌گیرد باکتری لاکتوباسیلوس بیشتری نسبت به دیگر مناطق استان کرمان وجود دارد از نمونه‌های ماست این منطقه در این تحقیق استفاده گردید که هدف از انجام این تحقیق جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از نمونه‌های ماست شهر بابک می‌باشد

مواد و روش‌ها

رقیق سازی نمونه های ماست و تلقیح روی

محیط کشت MRS-2Agar

تعداد 20 نمونه ماست از نقاط مختلف شهر و روستاهای اطراف منطقه شهر بابک کرمان

باکتریهای پروبیوتیک به میکروارگانیسمهای زنده و فعالی گفته می‌شود که با استقرار در بخشهای مختلف بدن (اساساً روده) و عمدتاً از طریق حفظ و توازن فلور میکروبی روده در برگیرنده خواص سلامت بخش برای میزبان هستند. باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از جمله باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد که برای اولین بار در سال 1900 از مدفوع نوزادان جداسازی شد. این باکتری دارای خصوصیتی مانند گرم مثبت، میله‌ای شکل با انتهای گرد، غیر متحرک، بدون تولید اسپور و کاتالاز منفی بوده که بیشتر در محصولات لبنی مانند ماست، شیر، پنیر و بخش‌هایی از دستگاه گوارش پستانداران نظیر روده انسان و همچنین حفره دهانی دیده می‌شود. باکتری مزبور از جمله باکتریهای هموفرم‌تاتیو بوده که از تخمیر قند، تنها اسید لاکتیک تولید می‌کند (Ganesh, 2006). Williams, 1986 روش‌های شناسایی غیر ملکولی دارای محدودیتهایی همانند قابلیت تکرارپذیری پایین و قدرت فرق گذاشتن کم بین سویه‌ها می‌باشند. با این وجود هنوز مود استفاده قرار می‌گیرند. به طور مثال، Pourahmad et al (2004) بر اساس روش‌های شناسایی غیر ملکولی از نمونه‌های ماست استان گیلان و گلپایگان به ترتیب 2 و 3 سویه لاکتوباسیلوس شناسایی نمودند که همگی بسیار ریز، کم رنگ، میله‌ای باریک و دراز بودند. به منظور شناسایی دقیقتر باکتریهای موجود در خانواده

¹ Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

² De Man, Rogosa and Sharpe

قطره از محلول آب اکسیژنه 3 درصد (معرف کاتالاز) به طور کامل مخلوط گردید، که در صورت تولید حباب روی اسلاید میکروسکوپی می‌توان گفت که این باکتری توانایی تولید آنزیم کاتالاز را داشته و کاتالاز مثبت می‌باشد (Naderi-Nasab, 1996).

خالص سازی کلنی مورد نظر و انتقال روی

محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar

در این مرحله کلنی‌هایی از باکتریهای گرم مثبت و کاتالاز منفی که در مراحل قبل شناسایی شده بودند بروی محیط MRS-Agar برده شده و خالص سازی گردیدند. سپس محیط کشت‌های مورد نظر در دمای 37°C ، به مدت 72 ساعت در داخل انکوباتور قرار داده شد، که پس از آن کلن‌های رشد یافته به وسیله لوپ استریل شده روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar، برده شده و این محیط نیز در شرایط رشدی مورد نظر در داخل انکوباتور قرار داده شد (Hardie, 1986; Kandler, and Weiss, 1986).

کشت نمونه شاهد مثبت روی محیط کشت

MRS-Sorbitol-Agar

در این تحقیق از کپسول تجاری اسیدوفیلوس استفاده شد. که پس از فعال سازی باکتری‌های موجود در کپسول، این باکتری‌ها روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar رشد داده شده و باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس خالص سازی گردید که این باکتری به عنوان نمونه شاهد مثبت در طول انجام تحقیق مورد

تهیه و به آزمایشگاه مربوطه انتقال یافت. جهت انجام رقیق سازی نمونه های ماست در این تحقیق از محلول رینگر، استفاده گردید که رقیق سازی تدریجی تا رقت 10^{-7} برای هر نمونه ماست انجام شد (Atlas, 1983). سپس تلقیح روی محیط کشت MRS-Agar، صورت گرفت و محیط کشتهای مورد نظر به مدت 72 ساعت در شرایط میکروآنروفل در داخل انکوباتور در درجه حرارت 37°C قرار داده شدند (Hardie, 1986; Kandler, and Weiss, 1986).

رنگ آمیزی گرم

در اینجا از کلنی های ریز رشد یافته روی محیط MRS-Agar (رقت‌های 10^{-3} ، 10^{-4} ، 10^{-6} ، 10^{-7}) که شکل ظاهری آنها به صورت صاف، براق و دارای حاشیه کامل بوده، به کمک سوزن کشت استریل نمونه برداری شد و برای انجام تست رنگ آمیزی گرم مورد آزمایش قرار گرفت. به منظور انجام رنگ آمیزی ابتدا از نمونه های ماست و کلنی‌های رشد یافته روی محیط MRS-Agar گسترش تهیه کرده سپس جهت مشاهده اسلایدها در زیر میکروسکوپ به ترتیب رنگها و محلول‌های کریستال ویوله، لوگول، استون الکل و فوشین افزوده شد (Naderi-Nasab, 1996).

تست کاتالاز

این تست جهت بررسی تولید آنزیم کاتالاز توسط باکتری مورد آزمایش انجام شد که جهت انجام این تست کلنی مورد نظر را با استفاده از یک سوزن استریل برداشته و بروی لام استریل قرار داده شد. سپس این کلنی با یک

سفالوتین⁴، استفاده شد. پس از گذاشتن این دیسک‌ها روی محیط کشت مورد نظر، کلیه محیط کشت‌ها در شرایط رشدی مورد نظر قرار داده شدند (Johnson et al., 1987; Marisa et al., 1982).

آزمایش تخمیر کربوهیدراتها (قندها)

در این آزمایش از 17 نمونه قند به نامهای آمیجدالین⁵، سلوبیوز⁶، اسکولین⁷، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، آرابینوز، گلوکونات⁸، مانیتول، رامنوز و ریوز استفاده گردید. ابتدا قندهای مورد نظر با استفاده از روش فیلتراسیون استریل گردیدند و سپس به محیط کشت Phenol Red Broth Base اضافه شده و پس از آن باکتری‌های مورد نظر به درون این محیط کشت تلقیح داده شدند جهت انجام تست تولید گاز به درون این محیط کشتهای لوله‌های دورهام که از قبل استریل شده بودند بطور وارونه به درون این محیط کشت‌ها اضافه گردیدند و محیط کشت‌های مورد نظر به مدت 3 تا 5 روز در انکوباتور 37 °C قرار داده شدند (Pourahmad, 2004).

تکثیر توالی جزئی ژن 16S rRNA

جهت تکثیر این قطعه ژنی از پرایمرهای اختصاصی PIB16

⁴- Cephalotin

⁵- Amigdaline

⁶- Cellobiose

⁷- Esculin

⁸- Gloconate

استفاده قرار گرفت (Hardie, 1986; Kandler, and Weiss, 1986).

توانایی رشد در دماهای مختلف

در این آزمایش ابتدا کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar (محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و کازئی) مجدداً زیر کشت گردیدند. محیط کشت‌های تلقیح شده در داخل انکوباتور یخچال دار 15 °C و انکوباتور 45 °C و در شرایط میکروآتروفیل به مدت 72 ساعت نگهداری شد. لازم به ذکر است که نمونه شاهد مثبت تلقیح شده روی محیط کشت اختصاصی نیز در دمای 15 °C و 45 °C قرار داده شد (Pourahmad, 2004).

آزمایش حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک

در این مرحله به منظور تلقیح باکتری‌های مورد نظر روی محیط کشت MRS-Agar، از سوآب‌های چوبی استریل استفاده شد. جهت شناسایی باکتری اسیدوفیلوس و خالص سازی کلنی‌های مورد نظر، این کلنی‌ها بوسیله سوآب-های استریل برداشته شده و روی محیط کشت MRS-Agar، برده شد. پس از این کار با استفاده از پنس استریل دیسک‌های آنتی بیوتیک موجود، روی محیط کشت تلقیح شده با باکتری، گذاشته شد. برای انجام این تست از دیسک‌های آنتی بیوتیک کانامایسین¹، ژنتامایسین²، آمپی سیلین³ و

¹- Kanamaicin

²- Gentamycin

³- Ampicilin

Shah (2000)، روش انتخابی ساده‌ای را برای جداسازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در حضور باکتری‌های طبیعی ماست و بیفیدوباکتریوم بر اساس تخمیر قند پیشنهاد کردند. این دانشمند مشخص کرد که روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar و یا Agar-MRS-Salicin، تنها باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی رشد می‌کنند. این باکتری‌ها با رشد روی این محیط کشت‌ها، قند سالیسین و سوربیتول را مورد استفاده قرار داده و روی محیط کشت کلنی‌های واضح و بزرگی را ایجاد می‌کنند. بدین ترتیب بابت‌گیری این محیط کشت‌ها باکتری‌های مورد نظر خالص سازی گردید (Shah, 2000). بررسی نتایج بدست آمده از کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar مشخص کرد که از بین 46 جدایه خالص سازی شده 23 جدایه به همراه نمونه شاهد مثبت توانستند روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar، رشد کنند. می‌توان بیان داشت که این جدایه‌ها باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی می‌باشند. به منظور جداسازی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از لاکتوباسیلوس کازئی می‌توان از تست‌هایی همانند توانایی رشد در دماهای مختلف، تست حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک، تست تخمیر قند، حساسیت به لیزوزیم، رشد در 0/2 درصد Oxgall و فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز نیز استفاده کرد که در این تحقیق از 3 تست اول برای شناسایی

(5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و MIB16 (5'GGCTGCTGGCACGTAGTTAG3') استفاده گردید واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت 5 دقیقه در 94 °C (*Hot star*) آغاز گردید و با انجام 35 سیکل متوالی (94 °C به مدت 15 ثانیه، 55 °C به مدت 15 ثانیه، 72 °C به مدت 1 دقیقه) و در پایان 72 °C به مدت 10 دقیقه به اتمام رسید. پس از آن به منظور شناسایی باکتری مورد نظر در سطح گونه فراورده‌های حاصل الکتروفورز گردیدند (Denis et al., 2002).

نتایج و بحث

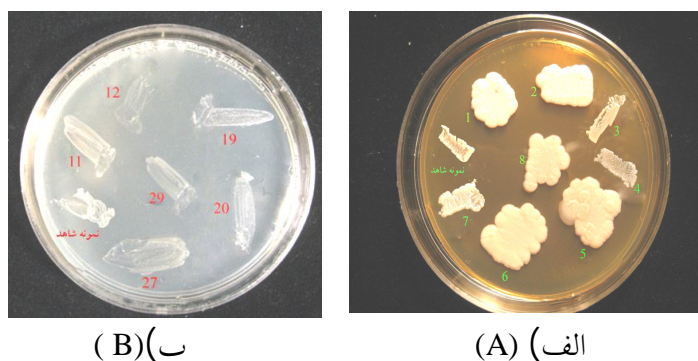
خالص سازی کلنی‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و انتقال روی محیط کشت MRS-Sorbitol-Agar

با بررسی میکروسکوپی نمونه‌های تهیه شده از کلنی‌های رشد یافته روی محیط MRS-Agar، 46 جدایه لاکتوباسیلوس جداسازی شد. نتایج آزمایش رنگ آمیزی گرم مشخص کرد که همه این جدایه‌ها باسیل‌های گرم مثبت میله شکل با انتهای گرد و فاقد اسپور می‌باشند که پس از رنگ آمیزی به رنگ بنفش در آمدند. همچنین نتایج بدست آمده از آزمایش کاتالاز نیز نشان داد که همگی این جدایه‌ها کاتالاز منفی می‌باشند و قادر به تجزیه کردن آب اکسیژنه و تولید حباب در زیر میکروسکوپ نبودند، که نتایج بدست آمده کاملاً با خصوصیات باکتری لاکتوباسیلوس مطابقت داشت. در پژوهشی

23 جدایه رشد یافته، 13 جدایه توانستند در دمای 45 °C رشد کنند ولی قادر به رشد در دمای 15 °C نبودند. این جدایه‌ها جدایه‌های نوع A و 10 جدایه باقیمانده نیز جدایه‌های نوع B نامگذاری گردید. همچنین مشخص شد که نتایج بدست آمده در مورد جدایه‌های نوع A با نتایج مورد انتظار در مورد باکتری اسیدوفیلوس کاملاً مطابقت داشت در حالی که جدایه‌های نوع B رفتاری کاملاً برعکس جدایه‌های نوع A را نشان دادند. جدایه‌های نوع A جهت انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند لازم به ذکر است که نمونه شاهد مثبت نیز رفتار رشدی مشابه جدایه‌های نوع A در دمای 45 °C و 15 °C از خود نشان داد.

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس استفاده گردید (Johnson et al., 1987; Wheater, 1955).

نتایج بررسی توانایی رشد در دماهای مختلف
 باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بهترین رشد را در شرایط میکروآئروفیل و در دمای 37 °C، به مدت 72 ساعت دارد. این باکتری قادر به رشد در دمای 45 °C بوده در حالی که توانایی رشد در دمای 15 °C را ندارد. باکتری لاکتوباسیلوس کازئی نیز رفتارهای رشدی متفاوتی را نسبت به اسیدوفیلوس از خود نشان می‌دهد (Lorca and De Valdez, 1998). در این تحقیق جدایه‌های رشد یافته روی محیط کشت اختصاصی مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج بدست آمده در شکل 1 نشان داد که از بین



شکل 1- خالص سازی جدایه‌های لاکتوباسیلوس و انتقال روی محیط کشت اختصاصی در دمای 45°C (الف) جدایه‌های لاکتوباسیلوس و نمونه شاهد مثبت. (ب) جدایه‌های رشد یافته روی محیط کشت اختصاصی در دمای 45 °C (نوع A) به همراه نمونه شاهد مثبت.

Figure 1- Isolation of *Lactobacillus* isolates on specific medium at 45°C. A) *Lactobacillus* isolates and positive control. B) Growth of *Lactobacillus* isolates and positive control on specific medium.

متفاوت با جدایه‌های نوع A و نمونه شاهد مثبت بود و مشخص شد که نتایج بدست آمده در مورد جدایه‌های نوع A، با خصوصیات باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کاملاً مطابقت دارد. Natt and Garcha (2011) مشاهده نمودند که *L. acidophilus* NCDC291 به آنتی بیوتیک‌های آمپی سیلین، اریترومایسین، استرپتومایسین، وانکومایسن، پنی سیلین، کلرامفنیکول و تتراسیکلین حساس بود. Ocana et al. (2006) استرین‌هایی از *L. acidophilus* پیدا نمودند که به وانکومایسین حساس بودند.

نتایج بررسی تخمیر قند

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس قادر به تخمیر قندهایی همانند آمیجدالین، سلویوز، اسکولین، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مالتوز، مانوز، سالیسین، سوکروز و سوربیتول می‌باشد (Williams, 1986). در نتیجه با تخمیر این قندها رنگ محیط کشت از قرمز به زرد تبدیل می‌شود. در حالی که این باکتری قادر به تخمیر قندهایی مانند آرابینوز، گلوکونات، مانیتول، رامنوز و ریوز نبوده و نمی‌تواند رنگ محیط کشت را تغییر دهد. نتایج بدست آمده در شکل 3 نشان می‌دهد که جدایه‌های نوع A، رفتاری مشابه باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را نشان دادند که نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از آزمایش تخمیر قند نمونه شاهد مثبت کاملاً مطابقت داشت.

نتایج بررسی حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک

باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک نئومایسین¹، پلی میکسین²، کانامایسین، ژنتامایسین و نیلی دیکسیک اسید³ مقاوم بوده و هاله ممانعت از رشد ایجاد نمی‌کنند، در حالی که نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیکی مانند ریفامایسین، سفالوتین، نووبیوسین⁴، پنی سیلین و آمپی سیلین حساس بوده و هاله ممانعت از رشد تولید می‌کنند. همچنین نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیکی مانند استرپتوماسین⁵، تتراساکلین⁶ و اکسی تتراساکلین⁷ واکنش متغیری را نشان می‌دهند (Johnson et al., 1987; Marisa et al., 1982).

نتایج بدست آمده از آزمایشات حساسیت و یا مقاومت به دیسک‌های آنتی بیوتیک در شکل 2، نشان داد که جدایه‌های نوع A، نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک ژنتامایسین و کانامایسین مقاوم بوده و هیچ گونه هاله‌ای ایجاد نکردند ولی نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک آمپی سیلین و ژنتامایسین حساس بوده و هاله تولید کردند. نمونه شاهد مثبت نیز همین رفتار را نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک نشان داد. این در حالی بود که رفتارهای رشدی جدایه‌های نوع B کاملاً

¹-Neomycin

²- Polymyxin

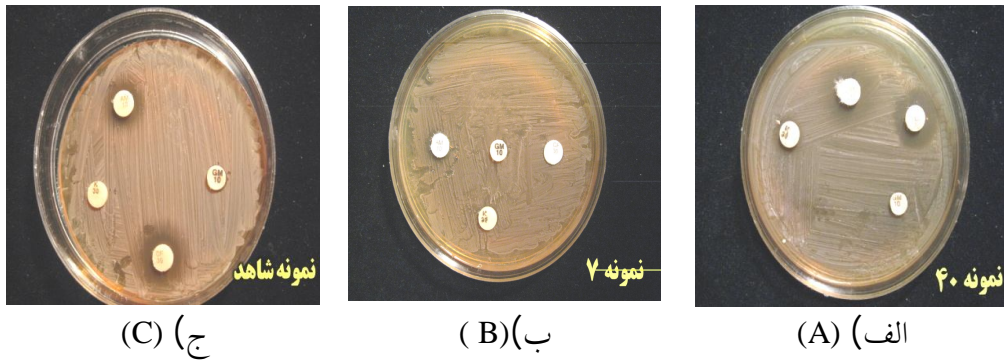
³- Nalidixic acid

⁴- Novobiocin

⁵- Streptomycin

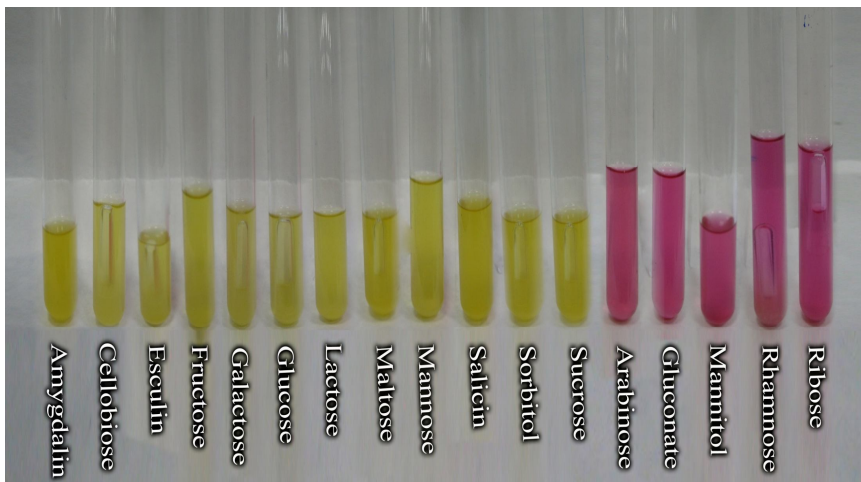
⁶- Tetracycline

⁷- Oxi tetracycline



شکل 2- حساسیت پذیری جدایه‌های مورد نظر و نمونه شاهد مثبت نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک. الف) جدایه‌های نوع A که نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک آمپی سیلین و ژنتامایسین حساس بوده و هاله تولید کردند. نمونه شاهد مثبت نیز همین رفتار را نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک نشان داد. ب) جدایه‌های نوع B که رفتار نامشابه با کنترل مثبت داشتند (ج) نمونه شاهد مثبت.

Figure 2- susceptibility of investigated isolates and positive control to antibiotic disks. A) Isolates A showed susceptibility to ampicillin and gentamicin as it is existed in positive control sample. B) Isolate B which showed different effect from positive control. C) positive control.



شکل 3- نتایج تست تخمیر قند بدست آمده از جدایه‌های نوع A.
Figure 3- Result of carbohydrates fermentation of isolates A.

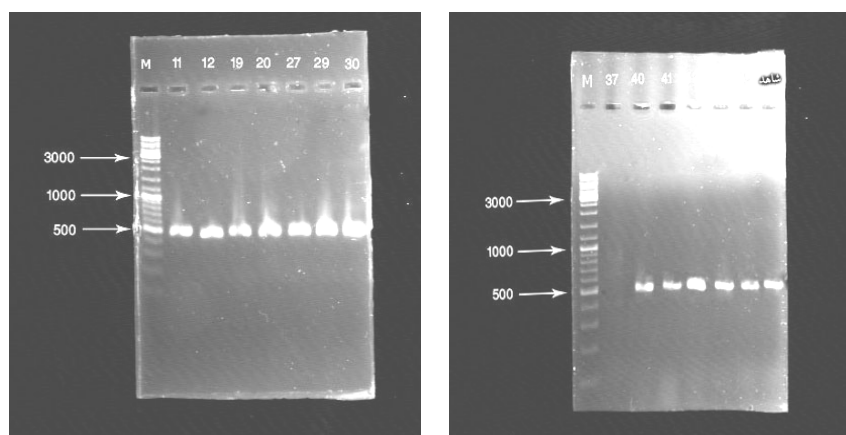
جدایه‌های نوع A به جز جدایه شماره 37 به همراه نمونه شاهد مثبت روی ژل آگارز 1 درصد یک بانده تقریباً 500 جفت بازی را دادند. این نتایج با نتایج مورد انتظار در مورد باکتری لاکتوباسیلوس منطبق بود. همچنین توالی جزئی ژن 16S rRNA جدا شده از جدایه شماره 12 توالی یابی گردید. نکته قابل توجه در رابطه با توالی نوکلئوتیدی جدایه شماره 12 یکسانی 93 درصدی و تشابه 97 درصدی با توالی جزئی ژن 16S rRNA استرین‌های باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجود در بانک جهانی ژن (NCBI) می‌باشد. Berger et al. (2007) توانست با توالی یابی ژن 16S rRNA گونه‌های *L. acidophilus* و *L. delbrueckii* را از *L. sakei plantarum* و *L. salivarius* مجزا و شناسایی نماید.

نتایج بدست آمده از جدایه‌های نوع B نیز با نتایج حاصل از جدایه‌های نوع A و نمونه شاهد مثبت کاملاً متفاوت بود. در پژوهشی Barrangou et al (2006) نشان دادند که باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس¹ (NCFM) قادر به تخمیر قندهایی همانند فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، سوکروز، لاکتوز، ترهالوز، رافینوز و فروکتولیگوساکاریدها می‌باشد.

نتایج بررسی تکثیر توالی جزئی ژن S 16rRNA خانواده باکتریایی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

در پژوهشی Kullen et al (2002) از تکثیر توالی جزئی ژن 16S rRNA، به عنوان یک روش سریع و مطمئن برای شناسایی باکتریهای موجود در خانواده باکتریایی اسیدوفیلوس استفاده کردند. این دانشمندان ابتدا در طی عمل PCR، به کمک پرایمرهای اختصاصی باندهایی به طول 500 جفت باز را بدست آوردند که مشخص کردند که این قطعه ژنی در نیمه اولش دارای منطقه متنوعی بطول 50 جفت باز می‌باشد که برای شناسایی کمپلکس اسیدوفیلوس بکار می‌رود. در این تحقیق از تکثیر توالی جزئی ژن 16S rRNA، استفاده گردید. در نتیجه تکثیر این قطعه ژنی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انتظار می‌رفت باندهایی بطول 500 جفت باز روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده گردد. نتایج بدست آمده در شکل 4 نشان می‌دهد که همه

¹ . North Carolina Food microbiology



شکل 4- باند حاصل از واکنش زنجیره ای اختصاصی قطعه ژن 16s rRNA، جدایه‌های نوع A با طول 500 bp.

Figure 4- PCR band of partial 16s rRNA gene from Isolates A by use of specific primers with 500 bp length.

یقیناً می‌توان گفت که این باکتری در ماستهای محلی شهر بابک کرمان وجود دارد و همچنین به کمک تکثیر ژن 16S rRNA، نیز می‌توان این باکتری را شناسایی کرد. جهت اطمینان از اینکه این باکتریهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جداسازی شده دارای خصوصیات پروبیوتیکی و درمانی ذکر شده هستند باید این باکتریها را در درون روده قرار داده و آن را تکثیر نمود. در انجام ادامه این تحقیق نیز می‌توان باکتریهای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جداسازی شده را از نظر قدرت و خواص پروبیوتیکی و درجه مفید بودنشان مورد مقایسه قرار داد.

نتیجه گیری

در این تحقیق جداسازی باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از ماست محلی شهر بابک کرمان مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به نتایج بدست آمده و مقایسه آن با نتایج بدست آمده در مورد باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس توسط دیگر دانشمندان (Bergeys et al., 2007) و همچنین مقایسه با نتایج به دست آمده از نمونه شاهد مثبت مشخص شد که همه جدایه‌های نوع A، جداسازی شده از نمونه های شهر بابک کرمان به جز جدایه شماره 37 باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌باشند و

منابع

- Atlas RM (1983). Experimental microbiology. Macmillan publishing company. New York.
 Barrangou R, Azcarate-Peril MA, Duong t, Connors SB, Kelly RM, Llaenhammer TR (2006).
 Global analysis of carbohydrate utilization by *Lactobacillus acidophilus* using cDNA

- microarrays. Proceeding of National Academy of Science of the Unites of America 103: 3816-3821.
- Berger B, Pridmore RD, Barretto C, Delmas-Julien F, Schreiber K, Arigoni F, Brüßow H (2007). Similarity and Differences in the *Lactobacillus acidophilus* Group Identified by Polyphasic Analysis and Comparative Genomics. *Journal of Bacteriology* 189: 1311-1321.
- Denis R, Pierre W, Daniel V, Francine M (2000). Molecular identification of potentially probiotic *Lactobacilli*. *Current Microbiology* 40:40-46.
- Ganesh S (2006). A novel yogurt product with *Lactobacillus acidophilus*. M.Sc. thesis. Louisiana USA. 50pp.
- Hardie JM (1986). In Bergey's manual of systematic bacteriology (eds. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. and Sharpe, M.E.)Vol. 2, William & Wilkins, Baltimore, PP. 1043-1070.
- Harold R, Curran L, Rogers A, Whittier EO (1932). The distinguishing characteristics of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Bacteriology* 25 (6): 595-621.
- Johnson MC, Bibek R, Tarun B (1987). Selection of *Lactobacillus acidophilus* strains for use in acidophilus products. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53: 215-231.
- Kandler, O. and Weiss, N (1986). In Bergey's manual of systematic bacteriology (eds.Sneath, P.H.A., Mair, N.S. andSharpe, M. E.) Vol. 1, William & Wilkins, Baltimore, PP. 1209-1234.
- Kefili T, Razavi SH, Emam-Jome Z, Salehi GR, Neghavi MR (2010). A Comparison of Two Molecular Microbiological Methods, RAPD-PCR and DGGE-PCR for Identification of Lactobacilli Strains Isolated During Lighvan Cheese Making Process. *Iranian Journal of Biosystems Engineering* 40: 35-45. (In Farsi)
- Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR (2002). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology* 89: 511-516.
- Lorca GL, de valdez GF (1998). Temperate adaptation and cryotolerance in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Biotechnology letters* 20: 847-849.
- Marisa V, Lorenzo M, Vittorio B (1982). Drug Resistance Plasmids in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus reuteri*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 43: 50-56.
- Naderi-Nasab M, Rashed T, Nazem (1996). *Laboratorial Bacteriology*. Astan Ghods Razavi publisher, Iran. (In Farsi)
- Natt NK, Gatcha S (2011). Antibiotic Sensitivity of Acid Stressed Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCDC 291. *The Internet Journal of Microbiology* 9: 1-10.
- Ocana V, Silva C, Nader-Macias ME (2006). Antibiotic Susceptibility of potentially probiotic vaginal Lactobacilli. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 18182:1-6
- Pourahmad R, Mazaheri-Assadi M, Mirdamadi, S (2004). Isolation and Identification of Iranian native Yoghurt starter. *Pajouhesh and Sazandegi* 65: 42-48. (In Farsi)
- Shah NP (2000) Probiotic bacteria:selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science* 83: 894-907.
- Wheater DM (1955). The characteristics of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of General Microbiology* 12: 123-132.
- Williams W (1986). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. William and Wilkins, Baltimore, 2: 1209-1235.

Isolation of *Lactobacillus acidophilus* from Sharbabk city yoghurt and its molecular characterization

Izadi M.¹, Fooladi M.H.², Sharifi Sirchi G.R.*³, Amini J.⁴

¹ MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Agricultural college, Shahid Bahonar university of Kerman, Iran.

² Associate Professor, Department. of Animal Sciences, Agricultural college Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.

³ Assistant Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Shahid Bahonar university of Kerman, Iran.

⁴ Master of Science, Department of Microbiology, Islamic Azad University of Kerman, Iran.

ABSTRACT

Lactobacillus acidophilus bacterium is one of the most useful specieses of *lactobacillus* genus, which can be seen as a probiotic microorganism in dairy products like yoghurt, milk and some portions of mammal digestive systems like human intestine. The bacterium is positive gram and negative catalaze, and has the best growth in 37 °C during 72 hours in microaerophil condition. In this research, local strains of *Lactobacillus acidophilus* are dissected from 20 yoghurt samples of Shahr babak city of kerman. In order to identify this bacterium from non-molecular methods including growth study in different degrees, studying of sensitivity or resistance to antibiotic disks and surveying growth behavior regarding to carbohydrate fermentation, As well as molecular methods partial 16S rRNA gene sequencing were used. Using these examinations, 12 isolates of *Lactobacillus acidophilus* were extracted, where coincidanced with the positive samples noted in the bergey's manual of systematic bacteriology. This is the first state report for isolation of *Lactobacillus acidophilus* isolates for local yoghurt of Shahr babak city of kerman.

Key words: *Lactobacillus acidophilus*, Gram Positive, Homofermentative, 16S rRNA Gene.

* Corresponding Author: Sharifi-Sirchi G.R.

Tel: 09131951969

Email: sharifisirchi@yahoo.com