مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 2، شماره 2، پاییز و زمستان 1389)

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

معین ایزدی[1]، محمدحسن فولادی[2]، غلامرضا شریفی سیرچی*[3]، جاوید امینی[4]

[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 گونه‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد که به عنوان یک میکرواورگانیسم پروبیوتیک در محصولات لبنی مانند ماست، شیر و بخش‌هایی از دستگاه گوارش پستانداران نظیر روده انسان دیده می‌شود. در این تحقیق سویه‌های بومی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از 20 نمونه از ماست‌های منطقه شهر بابک کرمان جداسازی گردید. به منظور شناسایی این باکتری از روشهای غیر ملکولی شامل بررسی رشد در دماهای مختلف، بررسی حساسیت یا مقاومت به دیسک‌های 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 روشهای برگی و نمونه شاهد مثبت مطابقت داشت. این اولین گزارش کشوری از جداسازی جدایه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از ماست‌های بومی شهر بابک کرمان می‌باشد.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، گرم مثبت، هموفرمنتاتیو، 16S rRNA.*

* نویسنده مسئول: غلامرضا شریفی سیرچی تلفن: 09131951969 E. Mail: sharifisirchi@yahoo.com

مقدمه

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 خصوصیاتی 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 هموفرمنتاتیو 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 می گیرند. به طور مثال، Pourahmad et al (2004) بر اساس روش های شناسایی غیر ملکولی از نمونه های ماست استان گیلان و گلپایگان به ترتیب 2 و 3 سویه لاکتوباسیلوس شناسایی نمودند که همگی بسیار ریز، کم رنگ،میله ای باریک و دراز بودند. به منظور شناسایی دقیقتر باکتریهای موجود در خانواده باکتریایی اسیدوفیلوس می‌توان از روش ملکولی همچون روش RAPD-PCR، DGGE[1] 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 می رود (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 جداساری سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از نمونه‌های ماست شهر بابک می‌باشد

مواد و روش ها

رقیق سازی نمونه های ماست و تلقیح روی محیط کشت MRS-Agar[2]

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

[1] Denaturating Gradiant Gel Electerophoresis
[2] De Man,Rogosa and Sharpe

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 میکروآئروفیل در داخل انکوباتور در درجه حرارت 37 ºC قرار داده شدند (Hardie, 1986; Kandler, and Weiss, 1986).

رنگ آمیزی گرم

در اینجا از کلنی های ریز رشد یافته روی محیط MRS-Agar (رقت‌های10^{-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 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 گرام 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

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 میکروآئروفیل 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 کانامایسین[1]، ژنتامایسین[2]، آمپی سیلین[3] و سفالوتین[4]، 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 آمیجدالین[5]، سلوبیوز[6]، اسکولین[7]، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، سالیسین، سوربیتول، سوکروز، آرابینوز، گلوکونات[8]، مانیتول، رامنوز و ریبوز 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 کشتها 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

[1]- Kanamaicin
[2]- Gentamycin
[3]- Ampicilin

[4]- Cephalotin
[5]- Amigdalin
[6] - Cellobiose
[7] - Esculin
[8] - Gloconate

(5ÁAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3`) و MIB16 (5ǴGCTGCTGGCACGTAGTTAG3´) استفاده گردید واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با مرحله دناتوراسیون اولیه به مدت 5 دقیقه در 94 ºC (*Hot star*) آغاز گردید و با انجام 35 سیکل متوالی (94 ºC به مدت 15 ثانیه، 55 ºC به مدت 15 ثانیه، 72 ºC به مدت 1 دقیقه) و در پایان 72 ºC 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

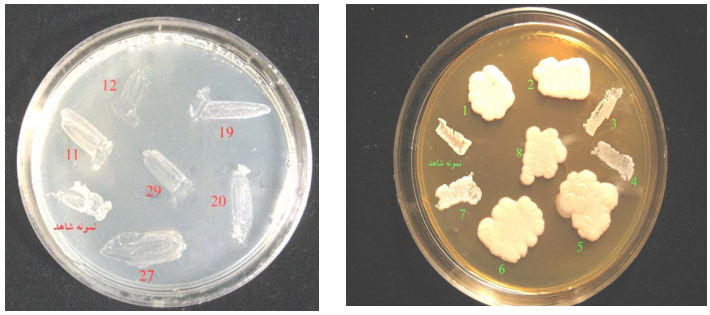
خالص سازی کلنی‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و انتقال روی محیط کشت MRS-Sorbotol-Agar

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 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 بابکارگیری این محیط کشت‌ها باکتری‌های مورد نظر خالص سازی گردید (Shah, 2000). بررسی نتایج بدست آمده از کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت MRS-Sorbotol-Agar مشخص کرد که از بین 46 جدایه خالص سازی شده 23 جدایه به همراه نمونه شاهد مثبت توانستند روی محیط کشت MRS-Sorbotol-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

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 ºC , به مدت 72 ساعت دارد. این باکتری قادر به رشد در دمای 45 ºC بوده در حالی که توانایی رشد در دمای 15 ºC 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 23 جدایه رشد یافته، 13 جدایه توانستند در دمای 45 ºC رشد کنند ولی قادر به رشد در دمای 15 ºC 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 Bرفتاری 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 ºC و 15 ºC از خود نشان داد.



ب)(B) الف) (A)

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.

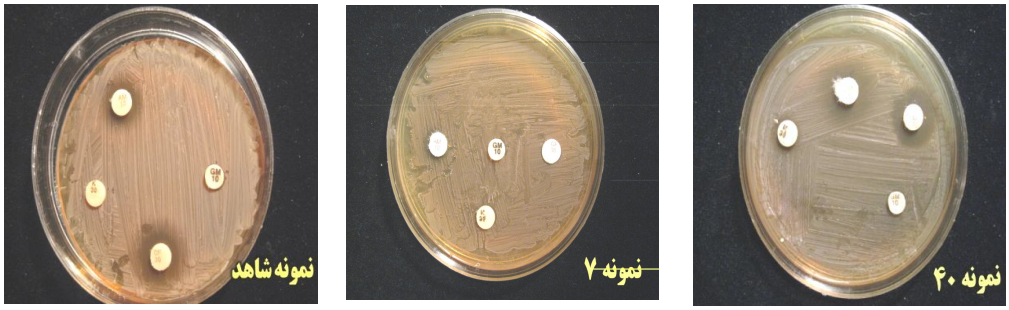
نتایج بررسی حساسیت یا مقاومت به آنتی بیوتیک

باکتری‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیک نئومایسین[1]، پلی میکسین[2]، کانامایسین، ژنتامایسین و نیلی دیکسیک اسید[3] مقاوم بوده و هاله ممانعت از رشد ایجاد نمی‌کنند، در حالی که نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیکی مانند ریفامایسین، سفالوتین، نووبیوسین[4]، پنی سیلین و آمپی سیلین حساس بوده و هاله ممانعت از رشد تولید می-کنند. همچنین نسبت به دیسک‌های آنتی بیوتیکی مانند استرپتوماسین[5]، تتراساکلین[6] و اکسی تتراساکلین[7] واکنش متغییری 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 متفاوت با جدایه‌های نوع A و نمونه شاهد مثبت بود و مشخص شد که نتایج بدست آمده در مورد جدایه های نوع A، باخصوصیات باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس کاملاً مطابقت دارد. Natt and Garcha (2011) مشاهده نمودند که *L. acidophilus NCDC*291 به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین، اریترومایسین، استرپتومایسین، وانکومایسن، پنی سیلین، کلرامفنیکول و تتراسیکلین حساس بود.Ocana et al (2006) استرین هایی از *L. acidophilus* پیدا نمودند که به وانکومایسین حساس بودند.

نتایج بررسی تخمیر قند

باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس قادر به تخمیر قندهایی همانند آمیجدالین، سلوبیوز، 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 ریبوز نبوده و نمی‌تواند رنگ محیط کشت را تغییر دهد. نتایج بدست آمده در شکل 3 نشان می‌دهد که جدایه‌های نوعA، 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.

[1]-Neomycin
[2]- Polymyxin
[3]- Nalidixic acid
[4] - Novobiocin
[5]- Streptomycin
[6]- Tetracycline
[7]- Oxi tetracycline

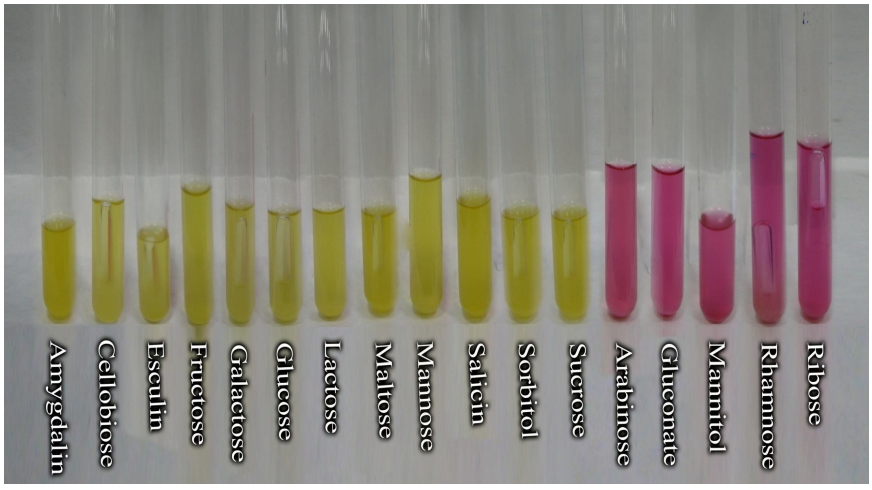


الف) (A)　　ب)(B)　　ج) (C)

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 ampicilin 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 .

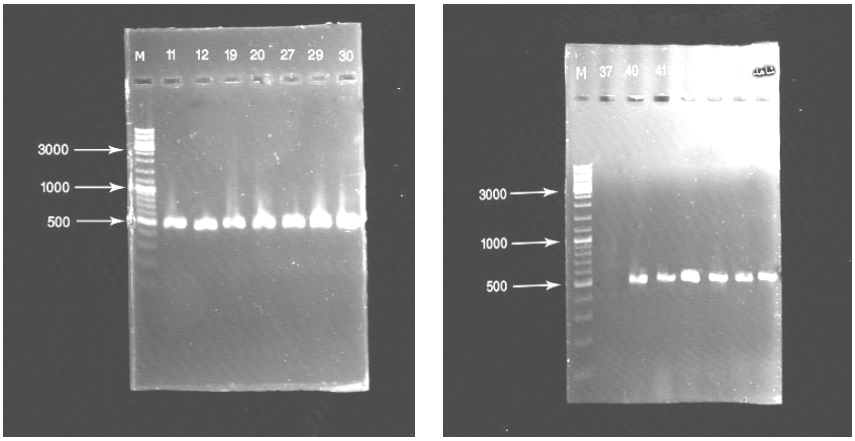
Figure 3- Result of carbohydrates fermentation of isolates A.

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 اسیدوفیلوس (NCFM)[1] 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، به‌کمک پرایمرهای اختصاصی باند-هایی به طول500 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 جدایه‌های نوع A به جز جدایه شماره 37 به همراه نمونه شاهد مثبت روی ژل آگارز 1 درصد یک باند 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 گونه های *L. acidophilus* و *L. delbrueckii* را از *L. plantarum*، *L. sakei* و*L. salivarius* مجزا و شناسایی نماید.

[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.

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 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.

منابع

Atlas RM (1983). Experimental microbiology. Macmillan publishing company. New York.

Barrangou R, Azcarate-Peril MA, Duong t, Conners 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 cryotelerance 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 yoghourt, 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 yoghourt 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 yoghourt 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