فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال چهارم، شماره ۱۳، بهار ۱۳۹۴، صفحه ۱۳۹- ۱۶۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۲۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۱/۳۱

جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از ارقام مختلف زیتون بومی ایران و بررسی فعالیت ضد میکروبی آن بر دو باکتری بیماری‌زای خانواده انتروباکتریاسه

زرین دخت امامی [*]: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، عضو هیأت علمی واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، zarrindokht20@gmail.com
الهام خلیلیان [**]: دانشجوی کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشگاه پیام نور، اصفهان، ایران، ekhalilian@gmail.com
مائده شاه سنایی [**]: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران، maedehshahsanaei@yahoo.com

چکیده

مقدمه: درمان با کمک میکروارگانیسم‌ها روشی نوین و در حال توسعه است که در این زمینه باکتری‌های پروبیوتیک به ویژه باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش اساسی دارند. زیتون از گیاهان پربار و مفید بومی ایران و سرشار از باکتری‌های اسیدلاکتیک است. در این مطالعه، تعدادی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از ارقام مختلف زیتون بومی ایران جدا و برخی خواص پروبیوتیکی آن‌ها بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا سویه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک از سه رقم زیتون بومی ایران بر روی محیط کشت MRS آگار جداسازی شد و پس از شناسایی‌های بیوشیمیایی و مولکولی، برخی خواص پروبیوتیکی شامل: مقاومت به اسید، صفرا و آثار ضدمیکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در برابر دو عضو بیماری‌زای خانواده انتروباکتریاسه شامل: *اشریشیا کلی* (PTCC1399) و *شیگلا دیسانتری* (PTCC1188) با استفاده از دو روش انتشار از چاهک و دیسک بررسی شد. به منظور کاهش خطا، هر آزمون سه بار تکرار شد. میانگین قطر هاله عدم رشد توسط سویه‌های مختلف جدا شده از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه مقایسه شد.

نتایج: از بین ۲۸ سویه جداسازی شده، بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، ۵۷ درصد سویه‌ها *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند. در بین این سویه‌ها، ۷۵ درصد سویه‌ها در برابر شرایط اسیدی و ۸۱/۲۵ درصد در برابر نمک‌های صفراوی، مقاوم یا بسیارمقاوم بودند. در بررسی‌های مولکولی، در واکنش PCR، ۶ سویه با آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باند اختصاصی تشکیل دادند. نتایج، توصیف کننده آثار ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از ارقام مختلف زیتون بومی ایران بر روی دو پاتوژن روده‌ای *اشریشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به وجود خواص پروبیوتیکی در سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از زیتون‌های بومی ایران، استفاده از آن‌ها برای پیشگیری و درمان عفونت‌های *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی* به‌عنوان راهکاری مهم و عملی قابل قبول است.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، پروبیوتیک، زیتون، پاتوژن‌های روده ای، خاصیت ضدمیکروبی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات
** عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

مقدمه

استفاده از پروبیوتیک‌ها برای افزایش سلامتی و بهبود فعالیت دستگاه گوارش سابقه‌ای دیرینه دارد (۲ و ۱)، ولی اختصاص دومین رتبه بیماری‌ها به بیماری‌های حاد دستگاه گوارش نشان دهنده آن است که از این توانمندی استفاده چندانی نشده‌است (۳). مطالعات انجام شده در سراسر جهان نشان‌دهنده وجود فعالیت ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها دربرابر باکتری‌های بیماری‌زاست (۵ و ۴).

درمان بیماری‌ها با کمک میکروارگانیسم‌ها روشی نوین و درحال توسعه است که از باکتری‌های مفید به عنوان عوامل درمانی دراختلالات ایمنی و بیماری‌های عفونی استفاده می‌شود. ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک، توانایی این باکتری‌ها در کاهش تعداد و کاهش قدرت بیماری‌زایی موجودات بیماری‌زاست (۲ و ۶).

باکتری‌های اسید لاکتیک[1] (LAB) گروهی از باکتری‌ها هستند که بر اساس مجموعه‌ای از ویژگی‌های ریخت‌شناسی، متابولیکی و فیزیولوژیکی در یک گروه قرار می‌گیرند. از لحاظ ریخت‌شناسی باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور، کوکسی، کوکوباسیل یا میله‌ای هستند که به طور معمول کاتالاز منفی و بی هوازی‌اند و گلوکز را به اسید لاکتیک یا به اسید لاکتیک، اتانول و دی‌اکسیدکربن تخمیر می‌کنند. این باکتری‌ها واجد سوپر اکسید دیسموتاز هستند و به طور متناوب رادیکال‌های پراکسید را با استفاده از آنزیم‌های پراکسیداز، سم‌زدایی می‌کنند. بنابراین، در حضور اکسیژن رشد می‌کنند و آئروتولرانت هستند. برخی گونه‌های این باکتری‌ها به طور طبیعی جزو فلور نرمال دهان، روده‌ها و واژن پستانداران هستند (۷). افزون بر آن، وجود باکتری‌های اسید لاکتیک در انواع فرآورده‌های غذایی تخمیری ثابت شده است (۸- ۱۲). این باکتری‌ها نقش اصلی در تخمیر میوه‌ها و سبزیجات از جمله دانه‌های زیتون دارند (۱۳- ۱۶). خواص پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک با منشا جداسازی مختلف تا کنون بارها بررسی شده است (۷-۹ و ۱۷). یکی دیگر از موارد کاربرد این باکتری‌ها، استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان وکتورهای تحویل مخاطی آنتی‌ژن‌ها و سیتوکین‌هاست که تحویل دارو از طریق مخاط، از روش‌های نوین تحویل دارو و واکسن است (۱۸).

لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی و معمولاً بی‌حرکت‌اند و به ندرت نیترات را احیا می‌کنند. این باکتری‌ها قادر به تخمیر گلوکز به شکل جور تخمیر یا ناجور تخمیر هستند. لاکتوباسیلوس‌ها مقاوم‌تر از سایر باکتری‌های اسید لاکتیک هستند و در منفی ۴ درجه سانتی‌گراد قادر به رشدند (۷ و ۱۰). *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[2] یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* است که معمولاً در مواد غذایی تخمیری یافت می‌شود (۸ - ۱۷ و ۱۹). این باکتری گرم مثبت قادر به هیدرولیز ژلاتین است و در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد به خوبی رشد می‌کند ولی در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد نیست. تولید مواد ضد میکروبی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به زنده ماندن این گونه در دستگاه گوارش کمک می‌کند (۲۰). مشخص شده است که این مواد ضد میکروبی آثار در خور توجهی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد. این باکتری تاریخچه‌ای طولانی از مصرف ایمن و طبیعی در انواع محصولات غذایی دارد. به همین علت در حال حاضر فعالیت وسیع ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل دارای پتانسیل درمانی برای جلوگیری یا درمان عفونت‌ها مطرح است (۲۰). انواع

سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، پتانسیل بالقوه‌ای در معرفی به عنوان پروبیوتیک دارند. اگرچه با وجود آثار مفید بی‌شمار، گاه محدودیت‌هایی برای استفاده وجود دارد از جمله آن که بعضی نژادها باعث فساد مواد غذایی هستند یا حتی گاهی بیماری‌زا می‌شوند (۲۱).

زیتون یکی از محصولات مهم کشاورزی و گیاهان پربار و مفید بومی ایران است که سرشار از باکتری‌های اسید لاکتیک و به ویژه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است و در حین مراحل تخمیر و تلخی‌زدایی از میوه زیتون (۱۳-۱۶، ۲۲) و برگ آن (۲۳) قابل جداسازی است. در سال ۲۰۱۳، خواص مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیکی که از دانه‌های زیتون یونانی تخمیری جداسازی شده‌اند مطالعه شده است (۱۶) بررسی تنوع جمعیت باکتری‌های دانه‌های زیتون با روش‌های مختلفی از جمله روش‌های مولکولی نظیر تحلیل با PCR-DGGE[۳] انجام شده است (۲۲). با توجه به تولید باکتریوسین‌هایی نظیر پلانتاریسین توسط این باکتری‌ها، حضور باکتری‌هایی نظیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در دانه زیتون می‌تواند به کنترل جمعیت میکروبی زنده[۴] موجود در آن منجر شود (۲۰ و ۲۴). با استفاده از توالی‌های اختصاصی و منحصر به فرد موجود در این باکتری می‌توان پروب‌های اختصاصی برای شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در منابع مختلف طراحی کرد (۲۵).

از سوی دیگر خانواده‌ی انتروباکتریاسه[۵] بزرگ‌ترین و نامتجانس‌ترین مجموعه باسیل‌های گرم منفی با اهمیت در پزشکی هستند و شامل ارگانیسم‌هایی می‌باشند که در همه جا حاضر هستند و در تمام جهان در خاک، آب و سبزیجات یافت می‌شوند و همچنین، به عنوان قسمتی از فلور روده ای نرمال در بیشتر حیوانات و انسان محسوب می‌شوند (۲۶). این باکتری‌ها عامل بیماری‌های مختلفی در انسان بوده و ۳۵ درصد کل باکتریمی ها، بیش از ۷۰ درصد عفونت‌های مجاری ادراری و بسیاری از عفونت‌های روده ای را به خود اختصاص داده‌اند. (۷ و ۲۶). بنابر آن چه گفته شد، پرداختن به روابط عملکردی بین پروبیوتیک‌ها و باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه امری مهم و جالب به نظر می‌رسد (۵، ۲۷ و ۲۸).

در این پژوهش، ابتدا در بین سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از ارقام مختلف زیتون بومی ایران، سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شد و از بین خواص پروبیوتیکی، عملکرد ضدمیکروبی سویه‌های انتخابی علیه دو باکتری از شایع‌ترین باکتری‌های پاتوژن دستگاه گوارش، *اشریشیا کلی*[۶] (PTCC1399) و *شیگلا دیسانتری*[۷] (PTCC1188) و نیز مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی آن‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از زیتون بومی ایران: سه نوع از ارقام مختلف زیتون بومی ایران شامل زیتون روغنی، زرد و ماری از باغ تحقیقاتی زیتون واقع در شهرستان طارم استان زنجان خریداری و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان انتقال داده شد. روش جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس روش اصلاح شده راندازو[۸] و همکاران (۲۲) و لاورمیکوکا[۹] (۱۴) انجام شد. مرحله تلخی‌زدایی و فرایند تخمیر نمونه‌های زیتون تهیه شده ابتدا در آب نمک و سپس، در آب نمک و سرکه انجام شد. در حین مراحل تخمیر، از آب نمک در شرایط استریل بر روی محیط MRSآگار[۱۰] کشت چمنی انجام شد و بعد از ۷۲ ساعت قرار دادن نمونه‌ها در انکوباتور و

در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد، محیط کشت‌ها بررسی و کلونی‌های سفید تا قهوه‌ای روشن که مشخصه باکتری‌های اسید لاکتیک است شمارش شد. برای اثبات وجود لاکتوباسیلوس‌ها رنگ آمیزی گرم، آزمون کاتالاز و حرکت انجام شد و باکتری‌های میله‌ای شکل گرم مثبت، بدون اسپور، کاتالاز منفی و حرکت منفی به عنوان *لاکتوباسیلوس* در نظر گرفته شد (۷).

شناسایی سویه‌های جداسازی شده: برای شناسایی سویه‌ها در حد جنس و گونه از آزمون‌های مختلف تخمیر کربوهیدرات‌ها، هیدرولیز ژلاتین و رشد در ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد (۷). به منظور شناسایی مولکولی، DNA باکتری‌ها با روش فنل-کلروفرم استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، با آغازگر[11]های طراحی شده برای توالی ITS[12] + *16S rDNA* *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، به روش PCR با افزایش تدریجی دما[13] انجام گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- توالی آغازگرهای طراحی شده در این پژوهش

آغازگر	توالی
Flplan	5-ACGAACTCTGGTATTGATTGG-3
R_1lplan	5-ACTTCACCCTAATCATCTGTC-3
R_2lplan	5-GGTGTTCTCGGTTTCATTATG-3

آغازگر Flplan آغازگر رفت[14] و آغازگر R_1lplan و آغازگر R_2lplan هر دو برگشت[15] هستند. آغازگر R_1lplan در داخل آغازگر R_2lplan طراحی شده است که به تکثیر قطعه‌ای اختصاصی‌تر منجر می‌شود. از این ویژگی آغازگرها می‌توان در مواقعی که PCR جواب نمی‌دهد استفاده کرد و با PCR آشیانه ای[16] امکان تکثیر قطعه و مشاهده باند مورد نظر را افزایش داد. آغازگر R_2lplan قطعه‌ای با طول bp1650 و آغازگر R_1lplan قطعه‌ای با طول bp1420 را تکثیر می‌کند.

همچنین، در این پژوهش از یک جفت آغازگر یاد شده در پایان نامه بالات[17] استفاده شد (۱۰). این آغازگرها و توالی آن‌ها در جدول۲ نشان داده شده‌است. هر پنج آغازگر به شرکت سینا کلون تهران سفارش داده و تهیه شد.

جدول ۲- آغازگرهای اقتباس شده و توالی آن‌ها

آغازگر	توالی
F: EGE1	5-AGAGGTTTTGATCCTGGCTCAG-3
R: L1	5-CAAGGCATCCACCGT-3

PCR با افزایش تدریجی دما[18]: این روش نوعی PCR است که درآن دما به تدریج بالا رفته و شرایط چسبیدن پرایمرها به تدریج سخت‌تر می‌شود. بنابراین، محصولات اختصاصی‌تری تکثیر خواهند شد. برنامه PCR با افزایش تدریجی دما که به دستگاه ترموسایکلر داده شد تا قطعه بزرگ را تکثیر کند در جدول ۳ آمده است. از هر دو پرایمر برگشت به طور جداگانه در انجام این PCR استفاده شد که البته نتایج کمابیش مشابهی به دست آمد.

جدول ۳- برنامه PCR با افزایش تدریجی دما

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان
۱	۹۴	۶ دقیقه
۲	۹۴	۳۰ ثانیه
۳	۵۰	۴۰ ثانیه
۴	۷۲	۲ دقیقه
۵	۱۵ بار تکرار، مراحل ۲ تا ۴	
۶	۹۴	۳۰ ثانیه
۷	۵۷	۳۵ ثانیه
۸	۷۲	۱ دقیقه و ۳۵ ثانیه
۹	۲۰ بار تکرار، مراحل ۶ تا ۸	
۱۰	۷۲	۵ دقیقه

سپس، به منظور بررسی دقیق‌تر سویه‌ها و شناسایی تفاوت‌های بین آن‌ها، از روش RFLP[۱۹] استفاده شد و تأثیر آنزیم‌های *TaqI* و *HaeIII* بر روی محصولات PCR بررسی شد. ویژگی آن‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است.

جدول ۴- آنزیم‌های استفاده شده و ویژگی آن‌ها

نام آنزیم	توالی مورد اثر	بهترین دمای فعالیت (درجه سانتی‌گراد)
(Bsnl) Hae lll	↓ 5 ….GGCC…. 3 3 ….CCGG…. 5 ↑	۳۷
Taq l	↓ 5 ….TCGA…. 3 3 ….AGCT…. 5 ↑	۶۵

برای انجام عمل RFLP، ۵ میکرولیتر از DNA (محصول PCR) با ۱۲/۵ میکرولیتر آب مقطر تزریقی و ۲ میکرولیتر بافر واکنش آنزیم مورد نظر و ۰/۵ میکرولیتر (۵ واحد) از آنزیم مورد نظر مخلوط شد و در دمای مخصوص واکنش به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. برای مشاهده نتیجه هضم آنزیمی، تمام محصول هضم آنزیمی با ۴ میکرولیتر بافر لودکننده[۲۰] مخلوط شد و در ژل آگاروز ۱/۲ درصد بارگذاری شد. الکتروفورز در ولتاژ ۷۰ ولت و به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید نتایج، مشاهده، عکس‌برداری و مطالعه شد.

بررسی آثار ضد میکروبی: بررسی آثار ضدمیکروبی هر یک از سویه‌های جداسازی شده طبق روش یاد شده توسط بالات با برخی اصلاحات انجام شد (۱۰). آثار ضدمیکروبی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده در برابر دو گونه پاتوژن دستگاه گوارش شامل *اشریشیا کلی* (PTCC1399) و *شیگلا دیسانتری* (PTCC1188) با استفاده از دو روش انتشار از چاهک و انتشار از دیسک بررسی شد. این دو سویه از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و بیماری‌زای ایران به شکل لیوفیلیزه تهیه شد و برای احیا بر روی محیط مایع واجد عصاره مغز و قلب[۲۱] (BHI براث) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

همچنین، در این پژوهش از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از ارقام مختلف تخمیر شده زیتون بومی ایران در شرایط آزمایشگاه استفاده شد. برای این منظور ابتدا از سویه‌های خالص جداسازی شده در محیط MRS مایع[۲۲] کشت داده شد و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از رسیدن کدورت باکتری‌ها به مقدار ۳×۱۰^{۸} سلول در هر میلی‌لیتر (جذب نوری[۲۳] OD ۰/۲۷۵ در ۶۰۰ نانومتر معادل ۱ مک فارلند)، ۵۰۰ میکرولیتر از هر محیط کشت در لوله‌های اپندورف استریل ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. سپس، مایع رویی دور ریخته شد و از رسوب موجود در ته اپندورف‌ها پس از سه بار شستشو با سرم فیزیولوژی استریل برای انتقال به چاهک‌ها و دیسک‌های بلانک استفاده شد.

در مرحله بررسی اثر مهاری، از هر یک از باکتری‌های پاتوژن احیا شده سوسپانسیونی معادل نیم استاندارد مک فارلند[۲۴] ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر (جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱در ۶۰۰ نانومتر) درمحیط TSB[۲۵] تهیه شد و سپس، از این سوسپانسیون در پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار[۲۶] (MHA) کشت چمنی انجام شد. در روش انتشار از چاهک ۴۰ میکرولیتر و در روش انتشار از دیسک ۲۰ میکرولیتر از رسوب سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

جداسازی شده بر روی کشت سویه‌های بیماری‌زا قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد باکتری‌های پاتوژن در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اندازه گیری شد. به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد و و میانگین قطر هاله عدم رشد توسط سویه‌های مختلف جدا شده مقایسه شد. برای مقایسه داخل گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه[۲۷] و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد.

بررسی مقاومت به اسید: بررسی مقاومت به اسید هر یک از سویه‌های جداسازی شده طبق روش یاد شده توسط بالات انجام شد (۱۰). ابتدا یک میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از سویه‌های جداسازی شده به ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS مایع تا میزان معادل تقریبی 10^6 واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی‌لیتر[۲۸] (cfu/ml) (OD برابر ۰/۱۳۲ در طول موج ۶۰۰) تلقیح و به مدت ۲۴ساعت انکوبه شد. از این لوله عنوان شاهد استفاده شد. برای بررسی مقاومت به اسید هر یک از سویه‌های جداسازی شده، به ۱۰میلی‌لیتر از محیط MRS مایع با اسیدیته ۲ و MRS مایع با اسیدیته ۳ که با استفاده از اسید کلریدریک ۳ مولار تهیه شده بود، یک میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته هر کدام از سویه‌های جداسازی شده تا رسیدن کدورت این محیط به میزان معادل تقریبی 10^6 واحد تشکیل دهنده کلونی در هر میلی لیتر (OD برابر ۰/۱۳۲ در طول موج ۶۰۰) تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس، ۰/۱ میلی‌لیتر ازهر یک از سویه‌های جداسازی شده رشد یافته در اسیدیته ۲ و ۳ در محیط MRS آگار به شکل چمنی کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، تعداد باکتری‌های زنده مانده در هر یک از شرایط اسیدی مورد آزمایش شمارش و با شاهد مقایسه شد. بسته به تعداد کلونی شمارش شده، واکنش سویه‌ها به شکل بسیار حساس، حساس، مقاوم و بسیار مقاوم گزارش شد. به طوری که تعداد کلونی رشد یافته در سویه‌های بسیار مقاوم غیر قابل شمارش بود. تعداد کلونی بیشتر از ۳۰۰ کلونی، سویه‌های مقاوم، تعداد کلونی بین ۳۰ تا ۳۰۰ سویه‌های حساس و تعداد کلونی کمتر از ۳۰، سویه‌های بسیار حساس نامیده شدند.

بررسی مقاومت به صفرا: طبق روش انجام شده توسط بالات، از کشت ۲۴ ساعته هر یک از سویه‌ها به میزان یک درصد به محیط MRS براث حاوی ۳ درصد نمک های صفراوی (اکسگال[۲۹]) تلقیح شد. همچنین، تلقیح مشابهی به محیط MRS براث فاقد نمک‌های صفراوی به عنوان شاهد انجام شد. بعد از تلقیح تا ۸ ساعت هر ۳۰ دقیقه و بعد از ۲۴ ساعت، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد (۱۰). تفاوت زمانی بر اساس دقیقه بین افزایش کدورت ۰/۳ واحدی در دو محیط یاد شده به عنوان زمان تاخیر رشد تعیین شد. ایزوله‌های بررسی شده بر اساس زمان تاخیر رشد در پنج گروه قرار گرفتند که در جدول ۵ نمایش داده شده است.

نتایج

در این مطالعه و در مرحله جداسازی ۲۸ سویه باکتری‌های اسیدلاکتیک در طی مراحل تلخی‌زدایی و تخمیر زیتون، تعدادی در مرحله ۸ ماه اول از آب نمک، تعدادی در مرحله دوم از آب نمک و سرکه و برخی از نمونه‌های زیتون بومی موجود در بازار جداسازی شدند. در جدول ۶، منشأ جداسازی هر یک از سویه‌های جداسازی شده نشان داده شده است.

جدول ۵- گروه بندی واکنش باکتری‌ها در برابر نمک‌های صفراوی براساس زمان تأخیر رشد

گروه	زمان تاخیر رشد
بسیار مقاوم	۳۰-۰ دقیقه
مقاوم	۶۰-۳۰ دقیقه
تحمل کننده	۹۰-۶۰ دقیقه
حساس	۱۲۰-۹۰ دقیقه
بسیار حساس	۱۸۰-۱۲۰دقیقه

جدول ۶- بررسی سویه‌های ۴ جدا سازی شده بر اساس نمونه زیتون و روش تلخی‌زدایی

	نوع زیتون	روش تلخی زدایی	شماره سویه	نوع زیتون	روش تلخی‌زدایی
۱	نمونه خریداری شده شیرین	-	۱۵	نمونه خریداری شده شیرین	-
۲	ماری	سود	۱۶	ماری سالم	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۳	روغنی حد واسط	سوزن زنی و آب نمک	۱۷	ماری حد واسط	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۴	زرد	سوزن زنی و آب نمک	۱۸	ماری حد واسط	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۵	ماری	سود	۱۹	ماری حد واسط	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۶	روغنی	سود	۲۰	ماری حد واسط	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۷	نمونه خریداری شده	-	۲۱	ماری حد واسط	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۸	ماری سبز	سوزن زنی و آب نمک	۲۲	نمونه خریداری شده تلخ	آب نمک
۹	ماری	سود	۲۳	ماری سالم	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۱۰	نمونه خریداری شده شیرین	-	۲۴	ماری سالم	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۱۱	ماری سبز	سوزن زنی و آب نمک	۲۵	ماری حد واسط	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۱۲	نمونه خریداری شده فله‌ای	-	۲۶	ماری سالم	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۱۳	روغنی حد واسط	سوزن زنی و آب نمک	۲۷	زرد ناسالم	سوزن زنی، آب نمک و سرکه
۱۴	نمونه صنعتی	روش صنعتی	۲۸	ماری سالم	سوزن زنی، آب نمک و سرکه

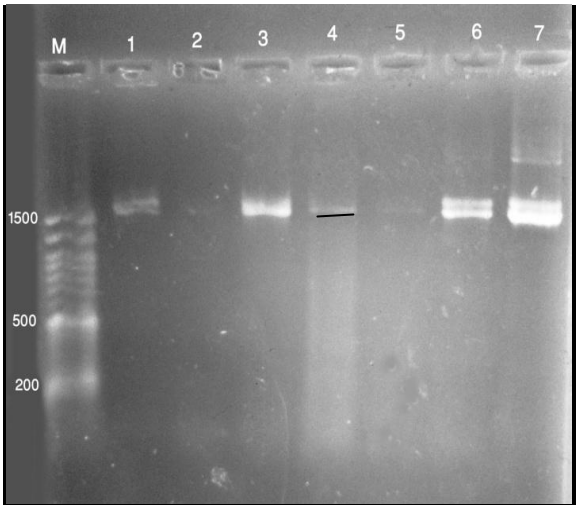
از ۲۸ سویه باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده، ۶۰ درصد از زیتون ماری، ۱۱ درصد از زیتون روغنی، ۴ درصد از زیتون زرد و مابقی از فرآورده‌های زیتون خریداری شده جداسازی شدند. پس از شناسایی اولیه، از آزمون‌های مختلف تخمیر کربوهیدرات‌ها برای شناسایی سویه‌های جداسازی شده استفاده شد.

بر این اساس، ۵۰ درصد از سویه‌های جداسازی شده به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند که نتایج آن در جدول ۷ آورده شده است. ۴۶/۶۷ درصد سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از زیتون ماری، ۲۰ درصد از زیتون روغنی و ۲۶/۶۷ درصد از فرآورده‌های زیتون خریداری شده جداسازی شدند.

جدول ۷- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و بررسی رشد سویه‌های جداشده از زیتون و فرآورده‌های تخمیری آن

شماره سویه	تخمیر قندها									رشد در ۱۵ درجه	رشد در ۴۵ درجه	هیدرولیز ژلاتین	باکتری شناسایی شده
	گالاکتوز	سالیسین	دسوربیتول	مانوز	تره هالوز	رافینوز	سلوبیوز	ریبوز	لاکتوز				
۱	−	−	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	unknown
۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۳	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum ATCC8014*
۵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۷	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۱۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۱۲	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۱۳	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۲۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۲۱	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*
۲۲	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum ATCC8014*
۲۳	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum ATCC8014*
۲۵	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum*
۲۶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	*Lactobacillus plantarum LRV1*

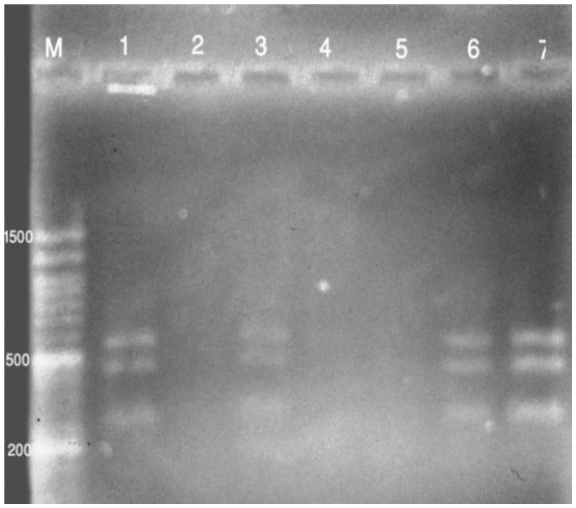
با توجه به اثبات خاصیت پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از زیتون در مطالعات قبلی، در این پژوهش علاوه بر روش‌های بیوشیمیایی، از روش‌های مولکولی نظیر PCR و RFLP برای شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بین سویه‌های جدا شده از زیتون بومی ایران استفاده شد. برای این منظور ابتدا استخراج DNA از نمونه‌های رشد کرده بر روی محیط کشت MRS آگار انجام شد. سپس، انواع روش‌های PCR مانند PCR با افزایش دما و PCR نیمه آشیانه ای[۳۰] بر روی DNA استخراج شده، با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* انجام شد. هفت سویه ۱، ۶، ۱۰، ۱۲، ۲۱، ۹ و ۱۶ تشکیل باند دادند که پنج سویه ی اول باند قوی و دو سویه ی ۹ و ۱۶ باند ضعیف تشکیل دادند. نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با افزایش دما با پرایمرهای F_1plan و R_2lplan در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصولات PCR با افزایش دمای تعدادی از سویه‌ها با پرایمر F_1plan و R_2lplan بر روی ژل آگاروز یک درصد، از لدر ۵۰ جفت بازی استفاده شده است. ستون ۱: سویه ۱، ستون ۲: سویه ۱۶، ستون ۳: سویه ۲۱، ستون ۴: سویه ۶، ستون ۵: سویه ۹، ستون ۶: سویه ۱۰، ستون ۷: سویه ۱۲

تکرارهای متوالی و تغییر شرایط PCR با هدف باند گرفتن از سویه‌های دیگر انجام شد ولی سویه‌های دیگر باند ندادند. برای مشاهده کردن باند اختصاصی در تعداد بیشتری از سویه‌ها، علاوه بر پرایمرهای قبلی از جفت پرایمر اقتباسی نیز استفاده شد. با این جفت پرایمر سویه شماره ۵ باند قوی و سویه شماره ۹ باند ضعیف تشکیل داد.

در ادامه روش RFLP بر روی DNA تکثیر شده، انجام شد. به این شکل که محصولات حاصل از PCR با آغازگرهای طراحی شده از هفت سویه ۱، ۶، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۶، ۲۱ و سویه استاندارد، با آنزیم‌های محدودگر TaqI و Hae III به طور جداگانه هضم شدند. نتیجه الکتروفورز محصولات PCR هضم شده با آنزیم Hae III در ژل یک درصد در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- نتایج RFLP محصولات PCR هضم شده با آنزیم Hae III
ستون M: لدر ۵۰bp، ستون ۱: سویه ۱، ستون ۲: سویه ۱۶، ستون ۳: سویه ۲۱، ستون ۴: سویه ۶، ستون ۵: سویه ۹، ستون ۶: سویه ۱۰، ستون ۷: سویه ۱۲

محصول PCR یکی از نمونه‌ها (شماره ۲۱) با هر دو آغازگر مربوطه تعیین توالی شد. توالی‌های استخراج شده از کروماتوگرام‌های حاصل از آغازگرهای رفت و

برگشت، ابتدا اصلاح شد. برای آن که بتوان ترادف نهایی قطعه تکثیر شده را پیدا کرد باید هردو ترادف استخراج شده از توالی‌یابی با دو آغازگر رفت و برگشت به شکل رفت در بیایند. بدین منظور با استفاده از نرم افزار آنلاین موجود در اینترنت (سایت بیوانفورماتیک[۳۱]) ترادف R_2lplan به صورت مکمل و برگشت شده در آمد. سپس، به منظور تصحیح توالی‌های ابتدایی و انتهایی، هر دو ترادف رفت با هم مقایسه شد و نقاط مشترک که در انتهای ترادف Flplan و ابتدای ترادف R_2lplan است تصحیح شد. بدین منظور دو ترادف در سایت NCBI [۳۲] مقایسه شد و نتیجه با کروماتوگرام و توالی‌های استخراج شده مقایسه شد.

ترادف صحیح در قسمت مشترک مد نظر قرار گرفت و دو قطعه رفت از محل مشترک به هم متصل شد. پس از تصحیح و چسباندن دو قطعه رفت به هم ترادفی حاصل می‌شود که در وسط هیچ خطایی ندارد. اما در دو انتها به علت مشکلات ترادف یابی ممکن است دچار خطا باشد. تعدادی از نوکلئوتیدهای ابتدایی و انتهایی این ترادف ۱۵۱۸ نوکلئوتیدی با مراجعه به کروماتوگرام و بررسی مجدد پیک‌ها و همچنین با بلاست کردن ترادف ۱۵۱۸ تایی با باکتری‌های راسته لاکتوباسیلال ها[۳۳] حذف شد و ترادف ۱۴۳۵ نوکلئوتیدی به وجود آمد که توالی آن در جدول ۸ آورده شده است.

جدول ۸- ترادف ۱۴۳۵ نوکلئوتیدی نهایی حاصل از تعیین توالی محصول PCR سویه ۲۱

ترادف ۱۴۳۵ نوکلئوتیدی
GACGAACTCTGGTATTACGAACCTCATAGAGTGTTGGAGTATGAGCAGCCGTGAGAAACAGATGCTAATACCGC ATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTAT TAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTG GGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATG GAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGT AACTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCT TCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGT AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGA GGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGT TGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTG AAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAAC CTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTG CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGC CAGCATTAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT CATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAG CTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTATT CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTA ACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGT AACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTG

ترادف۱۴۳۵ نوکلئوتیدی در سایت NCBI با باکتری‌های راسته لاکتوباسیلال بلاست شد. نتایج گویای آن است که ترادف حاصل با سویه‌های *Lactobacillus plantarum* همولوژی بالا دارد:

Max ident= 99 percent
Quary coverage= 96 percent

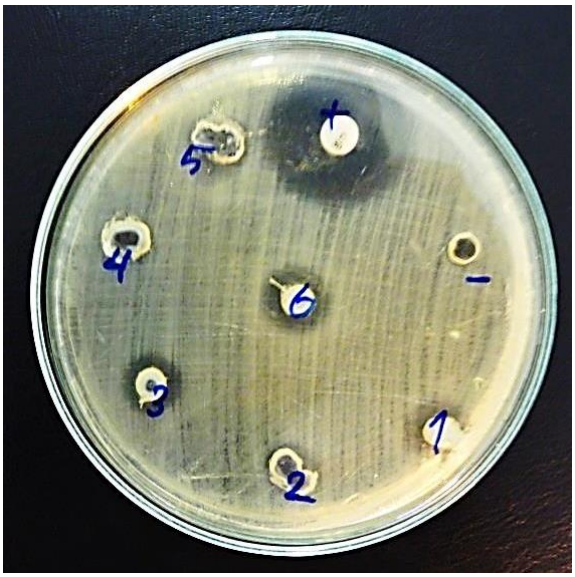
بررسی مقاومت به اسید و صفرا: پس از رویارویی سویه‌های جداسازی شده در برابر نمک‌های صفراوی و شرایط اسیدی، مقاومت سویه‌ها پس از سه بار تکرار بررسی شد. نتایج در جدول ۹ نشان داده شده است.

جدول ۹- واکنش سویه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداسازی شده در برابر نمک‌های صفراوی و شرایط اسیدی

شماره سویه	واکنش به صفرا	واکنش به اسیدیته ۲	واکنش به اسیدیته ۳
۱	تحمل کننده	نیمه مقاوم	نیمه مقاوم
۲	تحمل کننده	مقاوم	بسیار مقاوم
۳	مقاوم	مقاوم	بسیار مقاوم
۵	مقاوم	بسیار مقاوم	مقاوم
۶	بسیار مقاوم	بسیار مقاوم	مقاوم
۷	مقاوم	نیمه مقاوم	نیمه مقاوم
۸	مقاوم	مقاوم	نیمه مقاوم
۱۰	بسیار مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۲	بسیار مقاوم	مقاوم	مقاوم
۱۳	مقاوم	نیمه مقاوم	مقاوم
۲۰	مقاوم	بسیار مقاوم	بسیار مقاوم
۲۱	بسیار مقاوم	بسیار مقاوم	بسیار مقاوم
۲۲	مقاوم	مقاوم	بسیار مقاوم
۲۵	تحمل کننده	مقاوم	بسیار مقاوم
۲۶	بسیار مقاوم	بسیار مقاوم	بسیار مقاوم
۲۸	بسیار مقاوم	حساس	حساس

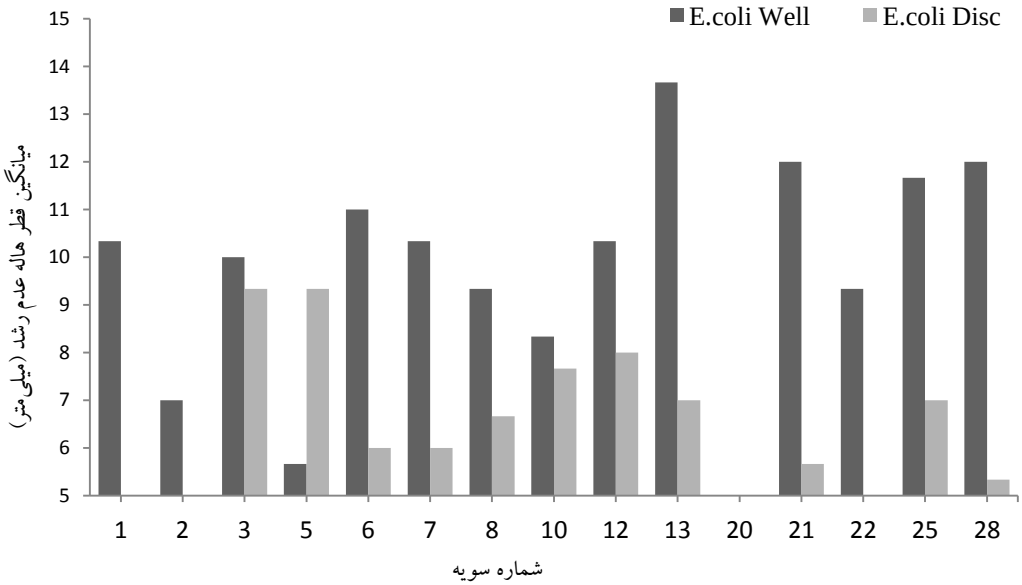
بررسی اثر مهاری: پس از سه بار تکرار هر آزمون، قطر هاله‌های عدم رشد ایجاد شده هر پاتوژن در برابر هر یک از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده بر حسب میلی متر اندازه گیری شد (شکل‌های ۳ و ۴). شکل‌های ۵ و ۶ به ترتیب نمودار میانگین سه بار تکرار قطر هاله عدم رشد *اشریشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری* هر سویه را با دو روش انتشار از چاهک و انتشار از دیسک نشان می‌دهد و در جدول ۱۰ نتایج آمار توصیفی قطر هاله عدم رشد باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری* با دو روش انتشار از دیسک و چاهک در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده بر حسب میلی متر نشان داده شده است.

نتایج نشان می‌دهند که سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای اثر مهاری بر روی *اشریشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری* هستند.

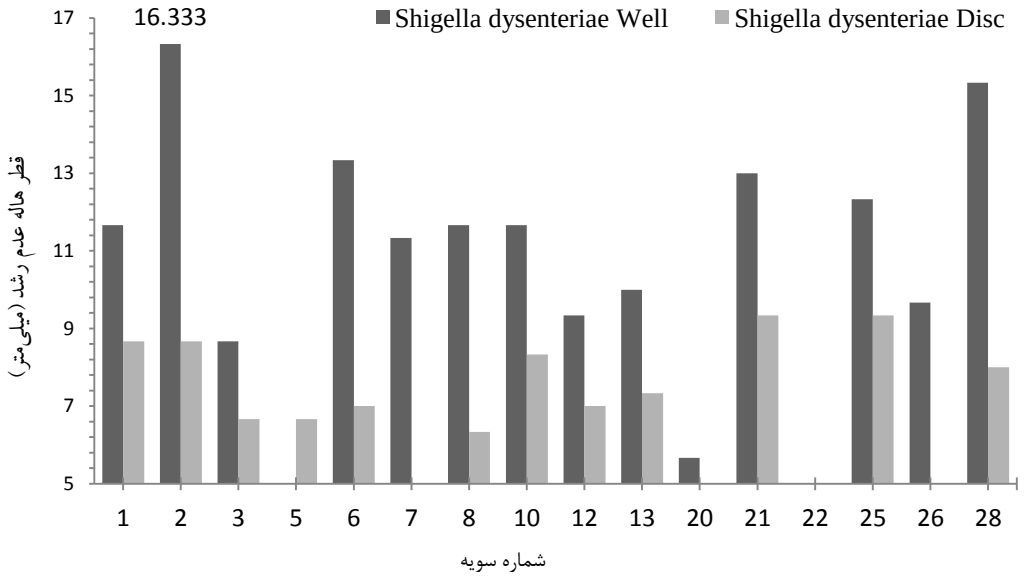


شکل ۳- اثر مهاری سویه‌های جداسازی شده در برابر پاتوژن شاخص گرم منفی *اشریشیا کلی* در روش انتشار از چاهک

شکل ۴- اثر مهاری سویه‌های جداسازی شده در برابر پاتوژن *شیگلا دیسانتری*



شکل ۵ - نمودار مقایسه میانگین سه بار تکرار قطر هاله عدم رشد *اشریشیا کلی* در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده با دو روش انتشار از دیسک و چاهک



شکل ۶ – نمودار مقایسه میانگین سه بار تکرار قطر هاله عدم رشد *شیگلا دیسانتری* در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده با دو روش انتشار از دیسک و چاهک

نتایج جدول ۱۰ نشان می‌دهد که *شیگلا دیسانتری* در روش انتشار از چاهک با میانگین ۳/۶۹۳۷۳ ± ۱۰/۶۲۶۰ میلی‌متر دارای بیش‌ترین حساسیت در برابر سویه های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است و *اشریشیا کلی* با روش انتشار از دیسک با میانگین ۱/۷۶۲۴۹ ± ۶/۵ میلی‌متر کمترین حساسیت را به باکتری‌های یاد شده نشان می‌دهد.

تحلیل واریانس یک طرفه نشان می‌دهد که به جز *شیگلا دیسانتری* در حالت انتشار از دیسک، اختلاف معناداری میان قطر هاله عدم رشد سویه‌های بیماری‌زای مورد بررسی در مقابل سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* وجود دارد (جدول ۱۱، *P value*<0.01).

ضرایب همبستگی پیرسون در بررسی دو به دو نمونه‌ها نیز نشان داد که تنها درمورد *شیگلا دیسانتری* اختلاف معناداری در سطح ۹۹ درصد میان استفاده از دو روش انتشار از دیسک و انتشار از چاهک وجود دارد. پس از تأیید وجود اختلاف بین هاله عدم رشد سویه‌های پاتوژن در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در آزمون تحلیل واریانس یک طرفه، به منظور بررسی دقیق‌تر بین سویه‌ها از آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. خلاصه مهم‌ترین نتایج به دست آمده از این آزمون در جدول ۱۲ نشان داده شده است.

جدول ۱۰– نتایج آمار توصیفی قطر هاله عدم رشد باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده

پاتوژن	تعداد	حداقل	حداکثر	میانگین (میلی‌متر)	انحراف معیار
اشریشیا کلی چاهک	۴۸	۵	۱۶	۱۰/۰۴۱۷	۲/۷۵۹۵۷
اشریشیا کلی دیسک	۴۸	۵	۱۰	۶/۵	۱/۷۶۲۴۹
شیگلا دیسانتری چاهک	۴۸	۵	۲۰	۱۰/۶۲۵	۳/۶۹۳۷۳
شیگلا دیسانتری دیسک	۴۸	۵	۱۲	۷/۰۸۳۳	۲/۲۶۷۵۶

جدول ۱۱- مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد سویه‌های پاتوژن در برابر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از طریق تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA)

		مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	درجه اطمینان
اشریشیا کلی چاهک	بین گروه ها	۳۱۱/۲۵۰	۱۵	۲۰/۷۵۰	۱۴/۲۲۹	۰/۰۰۰
	داخل گروه ها	۴۶/۶۶۷	۳۲	۱/۴۵۸		
	مجموع	۳۵۷/۹۱۷	۴۷			
اشریشیا کلی دیسک	بین گروه ها	۹۶/۰۰۰	۱۵	۶/۴۰۰	۴/۰۹۶	۰/۰۰۰
	داخل گروه ها	۵۰/۰۰۰	۳۲	۱/۵۶۳		
	مجموع	۱۴۶/۰۰۰	۴۷			
شیگلا دیسانتری چاهک	بین گروه ها	۵۰۷/۲۵۰	۱۵	۳۳/۸۱۷	۸/۰۷۶	۰/۰۰۰
	داخل گروه ها	۱۳۴/۰۰۰	۳۲	۴/۱۸۸		
	مجموع	۶۴۱/۲۵۰	۴۷			
شیگلا دیسانتری دیسک	بین گروه ها	۱۰۷/۶۶۷	۱۵	۷/۱۷۸	۱/۷۱۴	۰/۰۹۸
	داخل گروه ها	۱۳۴/۰۰۰	۳۲	۴/۱۸۸		
	مجموع	۲۴۱/۶۶۷	۴۷			

جدول ۱۲- معرفی مؤثرترین و بی‌اثرترین سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده در برابر پاتوژن‌های مورد بررسی با مقایسه میانگین سه بار تکرار اندازه قطر هاله عدم رشد (بر حسب میلی متر) با استفاده از آزمون تعقیبی LSD

پاتوژن مورد بررسی	موثرترین سویه ها	حداکثر قطر هاله عدم رشد/میلی‌متر	بی اثرترین سویه ها	حداقل قطر هاله عدم رشد/میلی‌متر
شیگلا دیسانتری دیسک	۲۱ و ۲۵	۹/۳۳۳۳ ± ۰/۵۷۷۳۵	۷ و ۲۰ و۲۲ و ۲۶	۵/۰۰۰ ±۰
شیگلا دیسانتری چاهک	۲	۱۶/۳۳۳۳ ± ۴/۰۴۱۴۵	۵ و ۲۲	۵/۰۰۰ ±۰
اشریشیا کلی دیسک	۳ و ۵	۹/۳۳۳۳ ± ۰/۵۷۷۳۵	۱ و ۲ و ۲۰ و ۲۲	۵/۰۰۰ ±۰
اشریشیا کلی چاهک	۲۶	۱۴/۶۶۶۷ ± ۱/۱۵۴۷	۲۰	۵/۰۰۰ ±۰

بحث و نتیجه‌گیری

افزایش بیماری‌ها و مسمومیت‌های ناشی از غذا به همراه مشکلات اقتصادی و اجتماعی حاصل از آن سبب گسترش مطالعات در زمینه تولید غذای سالم و به‌کار گیری ترکیبات ضدمیکروبی جدید شده است.

اسانس‌های حاصل از گیاهان و باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک (به ویژه گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس‌ها) واجد آثار ضد میکروبی شناخته شده‌ای هستند که می‌توانند در جهت کنترل و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن و عامل فساد منتقل شونده از مواد غذایی به جای نگهدارنده‌های شیمیایی و مصنوعی استفاده شوند (۶).

بر طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت و غذا[۳۴] باکتری‌های لاکتیک اسید دارای تاریخچه ی طولانی در فرآورده‌های تخمیری هستند و به طور طبیعی ساکن لوله گوارشی انسان می‌باشند (۲۱). این باکتری‌ها به علت ایجاد آثار مثبت در روند سلامتی افراد دارای اهمیت هستند (۱۴). ممانعت از فعالیت پاتوژن‌ها توسط

پروبیوتیک‌ها می‌تواند تأثیر مهمی در سلامتی فرد در مقابل عفونت با پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش داشته باشد (۵ و ۲۹). در واقع امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان عوامل مدیریتی عفونت‌های روده‌ای شناخته شده‌اند. آن‌ها با مکانیسم‌های متعددی شامل ترشح مواد ضدمیکروبی و آثار آنتاگونیستی با پاتوژن‌ها در اتصال به جایگاه‌ها و کلونیزاسیون در سطوح مخاطی روده که به رقابت در کسب مواد غذایی و تکثیر بین پروبیوتیک و پاتوژن منجر می‌شود، فعالیت می‌کنند. این باکتری‌ها با آثار باور[۳۵] بر افزایش تولید آنتی بادی، تحریک پاسخ ایمنی ترشحی یا عمومی، حذف رقابتی، تغییر شرایط دستگاه گوارش با تاثیر بر روی اسیدیته، تولید اسیدهای چرب زنجیرکوتاه و تولید باکتریوسین‌ها به‌طوری که برای پاتوژن‌ها مطلوب نباشد، تغییر سایت‌های اتصال توکسین‌ها، تغییر فلور دستگاه گوارش، اتصال به موکوس دستگاه گوارش و جلوگیری از اتصال پاتوژن‌ها برای رقابت در کسب مواد غذایی باعث جلوگیری از عفونت‌های دستگاه گوارش می‌شوند (۶). نتیجه این واکنش‌ها تعدیل سیستم ایمنی و سودمندی مجموعه پروبیوتیک‌ها بر سلامتی میزبان است (۲۹). اگرچه این آثار با نتایج مشهود از آزمایش‌های متعدد در شرایط آزمایشگاه و مطالعات حیوانی تأیید شده است ولی تاکنون بیشتر توصیه‌های پزشکی ثبت شده در استفاده از پروبیوتیک‌ها همراه با مشکلات و عوارض گوارشی مانند عدم تحمل لاکتوز، اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و اسهال‌های باکتریایی و ویروسی بوده است. افزون بر این، اساس مطالعات کلینیکی بر روی پروبیوتیک‌ها به عنوان یک روش جدید در درمان بیماری‌های آلرژی به ویژه در کودکان و در درمان و جلوگیری از بیماری‌های التهابی روده بوده است. البته لازم است یادآوری شود که تمام سویه‌های اسید لاکتیک آثار پروبیوتیکی از خود نشان نمی‌دهند. مقایسه مستقیم سویه‌ها، گونه‌ها و جنس‌ها به ندرت انجام گرفته است و تعمیم آثار پروبیوتیک‌ها در سطح جنس و گونه غیر ممکن است. بنابراین در این پژوهش، از بین خواص پروبیوتیکی، خواص ضدمیکروبی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از زیتون بومی ایران بررسی شده است و همانگونه که در ادامه بیان خواهد شد، تفاوت چشمگیر حتی بین خواص ضدمیکروبی سویه‌های مختلف یک گونه در برابر یک نوع پاتوژن وجود دارد.

با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک جدا شده از انواع مواد غذایی شامل لبنیات، سبزیجات، میوه‌ها، غذاهای فرآوری شده و نوشیدنی‌های تخمیری شناسایی شده‌اند (۸- ۱۲، ۱۷، ۲۲، ۲۴، ۲۵ و ۲۷). در ایران نیز تاکنون مطالعات متنوعی بر روی جداسازی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک از منابع مختلف و بررسی خواص پروبیوتیک آن‌ها انجام شده است. نوروزی[۳۶] و همکاران در سال ۱۳۸۰، ۱۶ لاکتوباسیل مختلف را از فرآورده‌های لبنی شهر تهران جداسازی و و شناسایی کردند و نشان دادند که این باکتری‌ها دارای خاصیت ضدمیکروبی در برابر *سوموموناس آئروژینوز*[۳۷]، *استافیلوکوکوس اورئوس*[۳۸]، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا انتریکاموریوم*[۳۹]، *باسیلوس سوبتیلیس*[۴۰] و *باسیلوس سرئوس*[۴۱] هستند. ۲۵ درصد از لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در این مطالعه

لاکتوباسیلوس پلانتاروم بوده است (۸). در سال ۱۳۸۶ تاج آبادی ابراهیمی[۴۲] و همکاران ویژگی‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از محصولات لبنی تخمیری لیقوان رابررسی و ۵۶ ایزومر باکتری اسید لاکتیک متحمل شرایط اسیدی را جداسازی کردند که ۴۸ سویه جنس *لاکتوباسیلوس* شناسایی شد و مقاومت به اسید و صفرای این باکتری‌ها ارزیابی شد. از این تعداد ۱۸ سویه توانایی جذب کلسترول را نیز داشتند. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد پنیر و ماست لیقوان دارای پتانسیل پروبیوتیکی هستند (۹). لطفی[۴۳] و همکاران در ۱۳۸۹ باکتری‌های با پتانسیل پروبیوتیکی را از محصولات لبنی و سراب جدا کردند. در این مطالعه برای شناسایی مولکولی سویه‌ها از آغازگرهای اختصاصی ژن *16S rDNA* استفاده و ۱۵ سویه لاکتوباسیلوس به عنوان فلور میکروبی طبیعی در محصولات لبنی این مناطق گزارش شد (۱۷). در پژوهشی که در کشور ترکیه در سال ۲۰۰۳ انجام شده است باکتری‌های مولد اسید لاکتیک شامل ۱۱۳ نوع باکتری کروی و ۲۱ نوع لاکتوباسیل که به عنوان استارتر در تولید پنیر کاربرد دارند با روش‌های غیر مولکولی و روش‌های مولکولی با استفاده از بررسی توالی *16S rDNA* و RFLP-PCR با آنزیم‌های TaqI و Hae III، شناسایی شدند (۱۰). در بین گونه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک، *Lactobacillus plantarum* نقش مهمی در تخمیر و فرآوری زیتون ایفا می‌کند و به عنوان یک پروبیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱۵ و ۲۰). در بین همه باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از زیتون در الجزیره، پرتغال، اسپانیا و ایتالیا گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گونه غالب معرفی شده است، هر چند گونه‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس*[۴۴] و گونه‌های *انتروکوکوس*[۴۵] در الجزیره (۱۵)، و گونه‌های *لوکونوستوک مزنتروئیدس*[۴۶] و دیگر گونه‌های *لوکونوستوک*[۴۷]، *انتروکوکوس فاسیوم*[۴۸] و *لاکتوباسیلوس کازئی*[۴۹] نیز جزو سایر موارد شناسایی شده در اسپانیا و ایتالیا بودند (۱۴ و ۲۲).

با توجه به موارد یاد شده سویه‌های *Lactobacillus plantarum* که از زیتون ایران جداسازی و شناسایی شده‌اند می‌توانند به عنوان پروبیوتیک‌های بالقوه در نظر گرفته شوند. حضور این باکتری‌ها در محصولات فرآوری شده زیتون، ارزش غذایی محصول را بالا می‌برد و در کنار زیتون که سرشار از مواد مغذی است خواص ارزشمند پروبیوتیکی را به محصول اضافه می‌کند.

در این پژوهش، پس از جداسازی اولیه سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک از زیتون بومی ایران، علاوه بر روش‌های بیوشیمیایی، از روش‌های مولکولی نظیر PCR و RFLP برای شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* استفاده شد. پس از انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گونه و هضم آنزیمی آن، الگوی باندی تشکیل شده در الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی، در هفت سویه یاد شده و سویه استاندارد، شبیه هم بودند (شکل ۲). این نتایج بیانگر آن است که سویه‌های ۱، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۲۱ کاملاً مشابه همدیگر هستند و تفاوت‌های ژنتیکی در آن‌ها در سطح این دو آنزیم به چشم نمی‌خورد. از طرفی می‌توان گفت برای آن که تفاوت

بین سویه‌ها به خوبی در عمل RFLP آشکار شود نیاز به استفاده از تعداد بیشتری آنزیم با اثر محدود است و دو آنزیم استفاده شده کافی نیستند. مقالات مختلف بیان می‌دارد در روش RFLP گاهی از دو آنزیم Taq I و Hae III (۱۰) و گاهی از دو آنزیم Acc II و Hae III (۱۱) استفاده شده است، در صورتی که در بعضی پژوهش‌ها از سه آنزیم Acc II , Hae III, Alu I (۲۷)، سه آنزیم Acc II, Hae III, Msp I (۱۱) و یا سه آنزیم Mbo I, Hha I, Hinf I (۲۸) استفاده شده است. استفاده از تعداد آنزیم بیشتر می‌تواند تفاوت بین سویه‌ها را بهتر آشکار سازد.

با بررسی نتایج مربوط به تعیین توالی محصول PCR سویه ۲۱ با هر دو آغازگر مربوطه و بلاست ترادف نهایی ۱۴۳۵ نوکلئوتیدی که در سایت NCBI با کد lcl|4417 نام‌گذاری شده است می‌توان با اطمینان گفت سویه ۲۱ که برای توالی‌یابی انتخاب شد یکی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است. از مجموع PCRهای انجام شده مشخص شد که سویه‌های شماره ۱، ۶، ۱۰ و ۱۲ باندهایی مشابه سویه ۲۱ و نمونه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*سویه *S ۱۷۶* [۵۰] تشکیل دادند. از نظر ریخت شناسی سویه‌های یاد شده (۱، ۶، ۱۰، ۱۲، ۲۱) و سویه استاندارد باسیلی شکل هستند. بر اساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های ۱، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۲۱ قطعاً از گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* هستند. این باکتری از نمونه‌های زیتون سایر نقاط دنیا از جمله الجزایر، اسپانیا، ترکیه و ایتالیا نیز جدا شده است و یافته‌های این پژوهش با نتایج یاد شده در منابع مختلف هم خوانی دارد.

ریخت‌شناسی سویه‌های ۹ و ۱۶ کوکوباسیل تشخیص داده شد که با سویه استاندارد و سویه شماره ۲۱ (باسیل) متفاوت است. همچنین، باند ایجاد شده در واکنش PCR ضعیف‌تر از باند سویه‌های ۱، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۲۱ بود. بنابراین، در مورد این سویه‌ها نمی‌توان به طور قطع اظهار نظر کرد. علت این‌که سویه‌های دیگر در PCR تشکیل باند ندادند و در مورد هویت آن‌ها نمی‌توان اظهار نظر کرد آن است که آغازگرهای به کار رفته، نتوانستند به توالی هدف متصل شوند. ممکن است آغازگرهای به‌کار رفته برای *16S rRNA* برای آن سویه مناسب نباشد یا اینکه امکان ایجاد پلی مورفیسم در ناحیه اتصال آغازگرها وجود دارد. نتایج مولکولی به دست آمده در این پژوهش با نتایج بیوشیمیایی (آزمون تخمیر قندها) هم‌خوانی دارد. آزمون تخمیر قندهای سویه‌هایی که به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تشخیص داده شدند تأیید کننده این مطلب است.

در این پژوهش با هدف بررسی خواص ضدمیکروبی به عنوان یکی از ویژگی‌های یک پروبیوتیک، میزان اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم‌های* جداسازی شده بر روی برخی پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش ارزیابی شد (۲). توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک برای تولید اسید (۳۰) و ترکیبات ضدمیکروبی از دیرباز برای نگهداری مواد غذایی مورد استفاده بوده است. تخمیر مواد غذایی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک مقدار کربوهیدرات‌های در دسترس را کاهش می‌دهد و به تولید انواعی از مولکول‌های با جرم مولکولی پایین منجر می‌شود که این ترکیبات فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند (۶ و ۳۰). از جمله این مواد می‌توان

اسیدهای آلی نظیر: اسید لاکتیک (۲۹ و ۳۰)، اسید استیک، اسید پروپیونیک، پراکسید هیدروژن، دی اکسید کربن، دی استیل، ترکیبات با وزن مولکولی پایین نظیر: رئوترین و رئوتری سیکلین توسط *لاکتوباسیلوس روتری*[۵۱]، ۲-پیرولیدون -۵- کربوکسیلیک اسید توسط *استرپتوکوکوس بوویس*[۵۲]، *لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه سودوپلانتاروم*[۵۳]، *لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی*[۵۴] و باکتریوسین‌ها نظیر نایسین[۵۵] و پلانتاریسین[۵۶] را نام برد (۲۹). به تازگی کشت‌های آغازگر جدیدی از باکتری‌های اسید لاکتیک با مزایای کاربردی مهم در صنعت توسعه یافته‌اند (۱۹).

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده دارای آثار ضدمیکروبی چشمگیری بر روی این پاتوژن‌های شایع می‌باشند. همانگونه که در جدول ۱۲ نشان داده شده است، در مورد باکتری *اشریشیا کلی* در روش انتشار از چاهک، سویه ۲۶ با میانگین ۱/۱۵۴۷۰ ± ۱۴/۶۶۶۷ میلی‌متر دارای بیش‌ترین خاصیت ضدمیکروبی است. این سویه در برابر نمک‌های صفراوی بسیار مقاوم و نسبت به شرایط اسیدی در اسیدیته‌های برابر ۲ و ۳ نیز بسیار مقاوم است (جدول ۹) و قابلیت استفاده به عنوان پروبیوتیک را دارد. در روش انتشار از دیسک، بیش‌ترین خاصیت ضدمیکروبی در برابر *اشریشیا کلی* به سویه‌های ۳ و ۵ با میانگین ۰/۵۷۷۳۵ ± ۹/۳۳۳۳ میلی‌متر متعلق است. این دو سویه نیز دارای مقاومت بالایی نسبت به صفرا و شرایط اسیدی هستند و می‌توانند به عنوان پروبیوتیک مصرف شوند. با توجه به این که میزان تلقیح سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده در هر چاهک دو برابر هر دیسک است، تفاوت در میانگین قطر هاله عدم رشد مشاهده شده در این روش قابل پیش‌بینی است.

در مورد باکتری *شیگلا دیسانتری* در روش انتشار از چاهک سویه ۲ با میانگین قطر هاله عدم رشد ۴/۰۴۱۴۵ ± ۱۶/۳۳۳۳ میلی‌متر، سویه ۲۸ با میانگین ۳/۲۱۴۵۵ ± ۱۵/۳۳۳۳ میلی‌متر و سویه ۶ با میانگین ۱/۵۲۷۵۳ ± ۱۳/۳۳۳۳ میلی‌متر دارای رتبه‌های اول تا سوم هستند. با توجه به الگوی مقاومت به اسید و صفرا (جدول ۹) سویه ۶ گزینه مناسب‌تری برای انتخاب به عنوان پروبیوتیک است. در روش انتشار از دیسک، سویه‌های ۲۱ و ۲۵ با میانگین ۹/۳۳۳۳ میلی‌متر دارای بیش‌ترین خاصیت ضدمیکروبی هستند که سویه ۲۱ با توجه به این که در مقابل نمک‌های صفراوی و شرایط اسیدی بسیار مقاوم است ترجیح داده می‌شود.

با توجه به این که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نقش مهمی در تخمیر و فرآوری زیتون ایفا می‌کند و به عنوان یک پروبیوتیک از اهمیت ویژه ا ی برخوردار است (۱۶، ۲۰ و ۲۴)، بنابراین سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی شده از زیتون بومی ایران می‌توانند به عنوان پروبیوتیک‌های بالقوه در نظر گرفته شوند. حضور این باکتری‌ها در محصولات فرآوری شده زیتون، ارزش غذایی محصول را بالا برده وخواص ارزشمند پروبیوتیکی را به محصول اضافه می‌کند. این مطالعه می‌تواند نخستین گزارش در مورد باکتری‌های اسید لاکتیک و پروبیوتیک جدا شده از زیتون ایران را ارایه دهد که با نتایج سایر کشورها همخوانی دارد (۱۳-۱۶، ۱۹، ۲۰ و ۲۲). هرتادو[۵۷] و همکاران در سال ۲۰۱۲ گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس*

پنتوسوس[۵۸] را به عنوان گونه‌های غالب در تخمیر زیتون معرفی کردند (۱۳).

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان ادعا کرد که استفاده از باکتری‌های لاکتیک اسید از جمله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان پروبیوتیک می‌تواند دارای اثر درمانی و پیشگیری کننده در عفونت‌های روده‌ای ناشی از *اشریشیا کلی* و شیگلا دیسانتری باشد. هر چند که وسعت بخشیدن به طیف ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها مستلزم پژوهش و بررسی‌های بیشتری است.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از نتایج طرح پژوهشی "جداسازی باکتری‌های مولد اسید لاکتیک به عنوان پروبیوتیک از میوه زیتون بومی و فرآورده‌های آن در ایران و بررسی خواص ضد میکروبی آن‌ها" اجرا شده در دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان است. نویسندگان مقاله لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، همچنین، دکتر کهین شاهانی پور، دکتر علی محمد احدی، خانم‌ها شادی شاهسار مهسا شفیقی و طاهره اسماعیلی برای همکاری در انجام مراحل مختلف این پژوهش، تشکر وقدردانی کنند.

References

(1) Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *The Journal of Nutrition* 2000; 130 (2): 384- 90.

(2) Reid G., Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 2002; 4 (3): 319- 24.

(3) Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illnesses--selected sites, United States. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 2003; 52 (15): 340- 43.

(4) Vejdani R., Zali MR. Probiotics and their mechanism of action in the prevention and treatment of human diseases *Journal of Research in Medical Science* 2003; 72 (4): 319- 30. [In Persian[.

(5) Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea. *The American Journal of Gastroenterology* 2000; 95 (1 Suppl): S16- 18.

(6) Elmer GV. Probiotics: 'Living Drugs'. *American Journal of Health System Pharmacy* 2001; 58 (12): 1101- 09.

(7) Todar K. Lactic Acid Bacteria. In*:* Todar's online textbook of bacteriology. [Online]. 2009; Available from: http://textbookofbacteriology. net/lactics. html.

(8) Noroozi J., Savadkoohi R., Jafari Nejad A., Nourbakhsh F. Isolation., Identification and Antimicrobial Activity of *Lactobacillus* from Dairy in Tehran- 1380. *Iranian Journal of Infectious Diseases and Tropical Medicine* 2004; 10 (28) 2- 6. [In Persian[.

(9) Tajabadi Ebrahimi M., Hejazi M., Anwari A. Probiotic Characterization of Lactobacillus isolated from Lighvan fermented dairy products. *Journal of Science Kharazmi Universiiy* 2007; 7 (3-4): 941- 52. [In Persian[.

(10) Bulut C. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese [dissertation]. Izmir, Turkey: Izmir Institute of Technology; 2003.

(11) Chen H C., Wang S Y and Chen M J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbioly* 2008; 25 (3): 492- 501.

(12) Chen Y-S., Yanagida F and Hsu J-S. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from dochi (fermented black beans), a traditional fermented food in Taiwan. *Letters in Applied Microbiology* 2006; 43 (2): 229- 35.

(13) Hurtado A., Reguant C., Bordons A and Rozès N. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology* 2012; 31 (1): 1- 8.

(14) Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S L., Gobbetti M., Baruzzi F., Morea M. Olive fermentation using lactic acid bacteria isolated from olive phylloplane and olive brines. IV I*nternational Symposum on olive growing. Acta horticulturae* 2002; 586: 621- 24.

(15) Mourad K. Zadi-karam Halima and Karam Nour-Eddine. Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green Algerian olives. *Grasas Y Aceites* 2004; 55 (4): 385- 93.

(16) Doulgeraki A I., Pramateftaki P., Argyri A., Nychas G-J E., Tassou C C and Panagou E Z. Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. *LWT-Food Science and Technology* 2013; 50 (1): 353- 56.

(17) Lotfi H., Hijazi MA., Maleki-Zanjani B., Barzegari A. Isolation, biochemical and molecular identification of bacteria with probiotic potential from dairy products of Harris and Sarab. *Journal of Food Research (Agricultural Science)* 2010; 3 (2): 1- 17. [In Persian].

(18) Zarkesh Esfahani S H., Shaykh Baygloo N., Emami Karvani Z., Sedighy Khavidak S., Jenab A ., Naghoni A. Novel Drug and Vaccine Delivery Systems. *Journal of Isfahan Medical School* 2012; 30 (196): 972- 80. [In Persian].

(19) Wouters D., Grosu-Tudor S., Zamfir M and De Vuyst L. Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2013; 93 (13): 3352- 61.

(20) Doulgeraki A I., Paraskevopoulos N., Nychas G-J E and Panagou E Z. An in vitro study of *Lactobacillus plantarum* strains for the presence of plantaricin genes and their potential control of the table olive microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek* 2013; 103 (4): 821- 32.

(21) Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization (FAO-WHO). *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. Washington, DC, 2002.

(22) Randazzo C L., Ribbera A., Pitino I., Romeo F V and Caggia C. Diversity of bacterial population of table olives assessed by PCR-DGGE analysis. *Food Microbiology*, 2012; 32 (1): 87- 96.

(23) Markin D., Duek L. Berdicevsky I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. *Mycoses* 2003; 46 (3-4): 132- 6.

(24) Martinez RC., Wachsman M., Torres NI., LeBlanc JG., Todorov SD., Franco BD. Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. *Food Microbiology* 2013; 34 (2): 376- 81.

(25) Ilenys M. Pe´rez-Dı´az. Putative and Unique Gene Sequence Utilization for the Design of Species Specific Probes as Modeled by *Lactobacillus plantarum*. *Current Microbiology* 2013; 66 (3): 266- 70.

(26) Murray PR., Rosenthal KS., Pfaller MA. *Entrobacteriaceae*; In: *Medical Microbiolog*y. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2006.

(27) Yanagida F., Chen Y-S., Shinohara T. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from soils in vineyards. *The Journal of General and Applied Microbiology* 2005; 51 (5): 313- 18.

(28) Rafat A M., Scott P T., Trebbin A L. The genetic diversity of lactic acid producing bacteria in the equine gastrointestinal tract.

FEMS Microbiology Letters 2005; 248 (1): 75- 81.

(29) Collado MC., Meriluoto J., Salminen S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International* 2007; 40 (5): 629- 36.

(30) Sarmast Ghahfarokhi E, Mobini Dehkordi M, Beheshtimaal K. Isolation and evaluation of lactic acid production content in native Lactobacillus of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (3): 41-52.

[1]- Lactic acid bacteria (LAB)
[2]- *Lactobacillus plantarum*
[3]- Polymerase Chain Reaction- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
[4]- Microbiota
[5]- Entrobacteriaceae
[6]- *Escherichia coli* PTCC1399
[7]- *Shigella dysenteriae* PTCC1188
[8]- Randazzo
[9]- Lavermicocca
[10]- Man- Rogosa Sharpe Agar
[11]- Primer
[12]- Internal Transcribed Spacer (ITS)
[13]- Touch up PCR
[14]- Forward
[15]- Reverse
[16]- Nested PCR
[17]- Bulut
[18]- Touch up PCR
[19]- Restriction Fragment Length Polymorfism
[20]- Loading buffer
[21]- Brain Heart Infusion Broth
[22]- Man- Rogosa Sharpe Broth
[23]- Optical Density
[24]- McFarland standard
[25]- Tryptic Soy Broth
[26]- Mueller Hinton Agar
[27]- ANOVA
[28]- Colony forming unit/milliliter (cfu/ml)
[29]- Oxgall
[30]- Semi Nested PCR
[31]- Bioinformatics
[32]- http://www.ncbi.nlm.nih.gov
[33]- Lactobacillales
[34]- Food and Agricultural Organization-World Health Organization (FAO/WHO)
[35]- Adjuvant
[36]- Noroozi
[37]- *Pseudomonas aeruginosa*
[38]- *Staphylococcus aureus*
[39]- *Salmonella entericamurium*
[40]- *Bacillus subtilis*
[41]- *Bacillus cereus*
[42]- Tajabadi Ebrahimi
[43]- Lotfi
[44]- *Lactococcus lactis*
[45]- *Enterococcus spp.*
[46]- L*euconostoc mesenteroides*
[47]- *Leuoconostoc spp*.
[48]- *Enterococcus faecium*
[49]- *Lactobacillus casei*
[50]- *Lactobacillus plantarum 174S*
[51]- *Lactobacillus reuteri*
[52]- *Streptococcus bovis*
[53]- *L. casei ssp. psudoplantarum*
[54]- *L. casei ssp. casei*
[55]- Nisin
[56]- Plantaricin
[57]- Hurtado
[58]- *Lactobacillus pentosus*

Isolation of *Lactobacillus plantarum* from different varieties of Iranian native olives and investigation of their antimicrobial activity against two pathogenic members of Entrobacteriaceae

Zarrindokht Emami *
Lecturer & P.hD. Student of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, zarrindokht20@gmail.com
Elham Khalilian
M.Sc. Student of Plant Biology, Young Researchers and Elite Club, Payame noor University, Isfahan, Iran, ekhalilian@gmail.com
Maedeh Shahsanaei
M.Sc. of Microbiology, Young Researchers and Elite Club, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, maedehshahsanaei@yahoo.com

Abstract

Introduction: Treatment with microorganisms is a new developing method that in this field, probiotic bacteria, especially lactic acid bacteria have a significant role. Olive is a productive and useful Iranian native plant which is rich in lactic acid bacteria. In this study, a number of *Lactobacillus plantarum* strains were isolated from Iranian native olives and some of their probiotic properties were investigated.

Materials and methods: At first**,** different strains of lactic acid bacteria were isolated from Iranian native olive on MRS agar medium, and after biochemical and molecular identification of bacteria, some probiotic properties such as acid and bile salt tolerance; and antimicrobial effects against two pathogenic species of Enterobacteriaceae, *Escherichia coli* (PTCC1399) and *Shigella dysenteriae* (PTCC1188) were studied by disk and well diffusion agar methods. According to error reduction, each test was performed in triplicate. Average zone of inhibition for each strain was compared by one-way ANOVA.

Results: According to biochemical tests, 57 percent of 28 isolated lactic acid bacteria were identified as *Lactobacillus plantarum*. Among these strains, 75 percent and 81.5 percent were acid and bile tolerance respectively. In the molecular analysis, 6 strains were shown specific bands in PCR reaction which performed by specific primers designed for *Lactobacillus plantarum*. The results described antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* isolated from Iranian native olives on two enteric pathogens, *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae*.

Discussion and conclusion: According to probiotic properties of isolated *Lactobacillus plantarum* from Iranian native olives, using them is acceptable as an important and practical approach to prevent infectious disease and its treatment due to *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae*.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, probiotic, Olive, Enteric pathogens, Antimicrobial effect

* Corresponding author
Received: October 13, 2013 / **Accepted:** April 20, 2014