

Antimicrobial properties of lactobacilli isolated from soya on *E. coli* and *Staphylococcus aureus*

Mahtab Naji*, Jamileh Norouzi, Parvaneh Saffarian

Department of Cellular and Molecular Biology, Microbiology and Genetics, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Research Sciences Branch, Tehran, Iran

(Received: 2019/06/30

Accepted: 2020/10/14)

Abstract

Background and Aim: Microorganisms in soy have many beneficial effects on human health. Useful microorganisms in soy include *Lactobacillus*. The aim of the current study was to determine the antimicrobial properties of *Lactobacillus* isolated from soybean on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Materials and Methods: A descriptive study was performed on 32 *Lactobacillus* isolated from soybeans for one year. First, soybeans were bought under different brands. In order to prepare soybean samples, attention was paid to the health of the seeds and the expiration date of the packaging and the health of the packaging. First, 10 grams of the soybeans was introduced into 50 ml of tap water. Catalase and oxidase tests were then performed on the colonies that appeared. Fermentation tests of different sugars and antimicrobial properties of isolated bacteria on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were examined. For molecular studies, the extracted DNA, along with specific primers, PCR, was performed to observe the antimicrobial gene of *Lactobacillus*. All tests were performed with three replications and the reported numbers are the average of the three replications.

Results: From among 32 isolated *Lactobacillus* isolated from 16 different soybean brands, the highest frequency was related to *Lactobacillus plantarum* with %21.8 and the lowest frequency was related to *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus pantris* each with %3.1) all of which had antimicrobial properties against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Lactobacillus plantarum* had a larger growth inhibition zone compared with other species. All samples examined in PCR test formed a band.

Keywords: Soybean; *Lactobacillus*; Antimicrobial properties; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

*Corresponding author: Mahtab Naji

Email: naji_mahtab@yahoo.com

بررسی خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس های جداسازی شده از سویا بر روی باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس

مهتاب ناجی*، جمیله نوروزی، پروانه صفاریان

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، میکروبیولوژی و ژنتیک، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۲۳

دریافت: ۱۳۹۹/۴/۹

چکیده:

سابقه و هدف: میکروارگانیسم های موجود در سویا بر روی سلامت انسان اثرات مفید بسیار زیادی دارند. از میکروارگانیسم های مفید در سویا می توان به لاکتوباسیل ها (Lactobacillus) اشاره کرد. هدف از این مطالعه، تعیین خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس های جداسازی شده از سویا بر روی باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بوده است.

مواد و روش ها: این مطالعه توصیفی است، که به مدت یک سال بر روی ۳۲ لاکتوباسیلوس جداسازی شده از سویا انجام شد. ابتدا سویا با مارک های متفاوت خریداری شد. برای تهیه نمونه های سویا به سالم بودن دانه ها و تاریخ انقضاء بسته بندی ها و سالم بودن بسته بندی توجه شد. ابتدا ۱۰ گرم از آن در ۵۰ میلی لیتر آب لوله کشی وارد شد. سپس تست کاتالاز و اکسیداز بر روی کلنی های ظاهر شده انجام شد. تست تخمیر قند های مختلف و خاصیت ضد میکروبی باکتری های ایزوله شده بر روی اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام مطالعات مولکولی، DNA استخراج شده، همراه با پرایمر های اختصاصی، عمل PCR برای مشاهده ژن خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس ها انجام شد. تمام تست ها با سه تکرار انجام گرفته است و اعداد گزارش شده میانگین سه تکرار است. **یافته ها:** از ۲۳ لاکتوباسیلوس ایزوله شده از ۶۱ مارک متفاوت سویا، (بیشترین فراوانی مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتروم با ۱۲/۸ درصد و کمترین فراوانی مربوط به لاکتوباسیلوس کازنی و لاکتوباسیلوس پانتزیس هر کدام با ۳/۱ درصد) بدست آمد. که همگی واجد خاصیت ضد میکروبی بر علیه باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بودند. باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم، دارای هاله عدم رشد بزرگتری نسبت به بقیه گونه ها بود. تمام نمونه های بررسی شده در تست RCP تشکیل باند دادند.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که استفاده از دانه های سویا از نظر غذایی برای تغذیه انسان مفید است. از دانه های سویا حاوی لاکتوباسیلوس هایی که خاصیت ضد میکروبی دارند را می توان در آینده در صنایع غذایی و دارویی برای سلامتی انسان و حیوانات بکاربرد.

واژگان کلیدی: دانه سویا، لاکتوباسیلوس، خاصیت ضد میکروبی، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس

مقدمه:

میزبان نقش به سزایی دارند. برخی از اختلالات و عفونت ها در بدن انسان به کمک لاکتوباسیلوس ها برطرف می شود. (۹) لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، فعالیت ضد باکتری علیه طیف گسترده ای از پاتوژن های گرم منفی و گرم مثبت را دارد. (۹) باکتری های جدا شده از سویای تخمیر شده، اسید های آلی با خاصیت ضد میکروبی به ویژه در برابر تولید می کنند. باکتری های جداسازی شده، فعالیت ضد میکروبی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی دارند (۱۲).

دانه های خشک سویا، ماده مغذی غنی از فیبر و منبع با کیفیت بالایی از پروتئین ها هستند (۱۶). اثرات محافظتی و درمانی مصرف سویا اثبات شده است. سویا و مواد غذایی حاوی سویا، اثرات مفید بالقوه ای بر سلامت دارند. (۴) مصرف سویا با کاهش خطر ابتلا به برخی از سرطان ها و کاهش بیماری های دوره سالمندی در ارتباط است (۱۸). همچنین مصرف سویا می تواند به کاهش خطر ابتلا به بیماری

از میکروارگانیسم های پروبیوتیک می توان در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری ها استفاده کرد. که از جمله آنها میتوان به باکتری های اسید لاکتیک و لاکتوباسیلوس ها اشاره کرد (۲-۱).

باکتری های اسید لاکتیک به علت فرآیندهای متابولیکی، ترکیبات ضد میکروبی مختلف مانند اسیدهای آلی (به ویژه اسید لاکتیک و استیک اسید)، پراکسید هیدروژن و پپتیدهای ضد میکروبی، از جمله باکتریوسین تولید می کنند. برخی از لاکتوباسیل ها، فعالیت آنتاگونیستی قوی علیه فساد و باکتری های بیماریزا و قارچ ها را نشان می دهد. اثر ضد میکروبی آن ها عمدتاً با تولید اسید های آلی و کاهش pH محیط ارتباط دارد (۳).

لاکتوباسیلوس ها، هنگامی که در مقادیر کم تجویز شوند، روی بهبود سلامت

نویسنده مسئول: مهتاب ناجی

پست الکترونیک: naji_mahtab@yahoo.com

مولر هیتونن آگار به وسیله سوآب استریل کشت داده شد. به محیط کشت مولر هیتونن آگار حاوی باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس انتقال داده شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد. (۱۱)

بررسی وجود ژن باکتریوسین با روش PCR

به منظور انجام این بررسی، ابتدا باکتری هایی که بیشترین خاصیت ضد میکروبی (لاکتوباسیلوس پلاتناروم و لاکتوباسیلوس آجیلیس) را نشان دادند، انتخاب شدند و برای هر یک، پرایمر های اختصاصی مربوط به ژن باکتریوسین آن گونه مورد نظر با استفاده از سایت NCBI انتخاب شدند سپس واکنش PCR و در نهایت الکتروفورز برای مشاهده ژن باکتریوسین این نمونه ها صورت گرفت. (۲۲)

تهیه پرایمر

برای این منظور ابتدا مقالات معتبر مورد بررسی قرار گرفت و توالی پرایمر های مورد نظر از مقاله Maldonado و همکاران در سال ۲۰۰۲ گرفته شد. سپس پرایمرهای مورد نظر را با استفاده از سایت NCBI از نظر اتصال اختصاصی به جایگاه ژنی، BLAST شدند. (۱۴)

استخراج DNA و PCR و الکتروفورز نمونه ها

استخراج DNA ژن پلاسمیدی این باکتری ها طبق دستورالعمل موجود در کیت استخراج، صورت گرفت، سپس نمونه ها طبق برنامه زمان بندی در جدول ۱-۲ تحت واکنش PCR قرار گرفتند. پس از تهیه ژل آکاورز و پس از بارگیری DNA در داخل ژل، جریان الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ میلی ولت برقرار شد. پس از ۳۵ دقیقه، ژل بر روی UV-Transilluminator قرار داده شد و باندهای DNA مشاهده گردید. تمام تست ها با سه تکرار انجام گرفته است و اعداد گزارش شده میانگین سه تکرار است. (۲۲)

یافته ها:

طبق نتایج بدست آمده، ۲۳ لاکتوباسیلوس، دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بودند.

تست تخمیر قند ها

برای شناسایی گونه ۲۳ نمونه لاکتوباسیلوس جدا شده از ۶۱ مارک مختلف سویا، از تخمیر ۰۱ قند مطابق جدول ۱ استفاده شد. گونه های تشخیص داده شده با استفاده از کتاب yegreB در جدول ۲ نشان داده شده اند. (۲۰)

جدول ۱: پرایمر اختصاصی طراحی شده برای ژن باکتریوسین

توالی و نوع پرایمر	نام ژن	نوع باکتری
Forward primer AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG Reverse primer CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA	(Lac KU161105.1)	Lactobacillus
Forward primer GCCGCCTAAGGTGGG- ACAGAT Reverse primer TTACCTAACGGTAAAT- GCGA	(LfprPlanII CP023772.1)	<i>L. plantarum</i>
Forward primer GTA- AAACGACGGCCAGT Reverse primer GGAAA- CAGCTATGACCATG	(M13 CP016766.1)	<i>L. agilis</i>

های مادرزادی کمک کند (۱۳). به علاوه سویا بر روی سلامت انسان اثراتی مانند کاهش کلسترول و اثرات ضد سرطانی دارد (۲).

پروتئین سویا، جزء اصلی رژیم غذایی برخی از افراد بوده و اخیراً به طور فزاینده ای در رژیم غذایی انسان مورد توجه قرار گرفته است. بیشتر محتوای پروتئین سویا را، اسید آمینه لیزین تشکیل داده است. سویا بر روی سلامت انسان اثراتی مانند کاهش کلسترول و اثرات ضد سرطانی دارد (۲).

چون امروزه اکثر باکتری ها به آنتی بیوتیک ها مقاوم شده اند و استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها باعث مقاومت میکروارگانیسم ها و شیوع گونه های مقاوم شده است، می توان از لاکتوباسیلوس ها که نوعی پروبیوتیک هستند، برای درمان و پیشگیری از بیماری های عفونی استفاده کرد. که این لاکتوباسیلوس ها را از سویا نیز می توان ایزوله نمود.

مواد و روش ها:

این مطالعه توصیفی است که بر روی ۳۲ لاکتوباسیلوس جداسازی شده از ۱۶ مارک متفاوت سویا انجام شد.

جداسازی لاکتوباسیلوس ها و شناسایی اولیه:

از مارک های مختلف سویای موجود در مغازه های سطح شهر تهران، ۱۶ بسته سویا خریداری شد. برای جداسازی لاکتوباسیلوس از سویا، ابتدا ۱۰ گرم از سویا در ۵۰ میلی لیتر آب لوله کشی برای حدود ۲۴ ساعت خیس شد. مقداری از آب سطحی سویا را درون محیط کشت MRS برات که از قبل تهیه شده بود، ریخته شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب نگهداری شد. سپس از محیط کشت که کدر شده بود، به محیط کشت MRS آگار که از قبل تهیه شده بود، منتقل شد و یک شب در ۳۷ سانتیگراد درجه نگهداری شد. پس از یک شب، روی پلیت کلنی های لاکتوباسیلوس مشاهده شد. بر روی کلنی های ظاهر شده رنگ آمیزی گرم و تست های بیوشیمیایی از جمله کاتالاز و اکسیداز انجام شد. (۱۵)

ذخیره سازی لاکتوباسیلوس ها

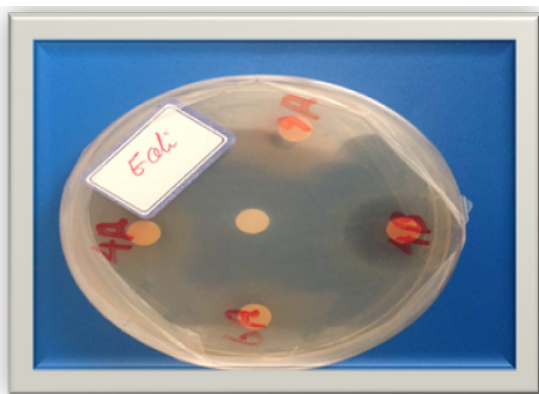
۳۲ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده در محیط لیتوموس میلک در ایندروف های ۵/ میلی لیتر در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند تا برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گیرند. (۷)

تست تخمیر قند ها برای شناسایی گونه لاکتوباسیلوس ها

برای تعیین گونه لاکتوباسیلوس های جداسازی شده، نمونه ها را از فریزر خارج کرده و در محیط کشت MRS آگار به صورت چهار مرحله ای کشت داده شدند و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. روز بعد کلنی ها روی محیط کشت مشاهده شدند. برای انجام تست تخمیر قند ها، از محیط کشت فنل رد برات استفاده شد. و تغییر رنگ لوله ها از قرمز به زرد بعد از گذشتن ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد یادداشت شد. با استفاده از جدول کتاب برجی بخش لاکتوباسیلوس ها، تعیین گونه صورت گرفت. (۲۰)

تست آنتی بیوگرام

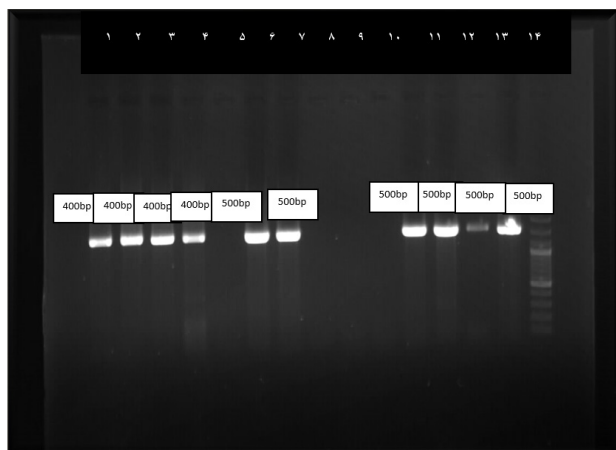
برای مشاهده خاصیت ضد میکروبی از تست آنتی بیوگرام به روش انتشار در آگار استفاده شد. برای انجام این تست، کلنی های لاکتوباسیلوس جداسازی شده به صورت جداگانه به محیط کشت MRS برات، منتقل شده و به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. روز بعد لوله ها ساتریفیوژ شد. از محلول رویی روی بلانک دیسک های استریل ریخته شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شوند. سپس سوسپانسیون میکروبی معادل استاندارد نیم مک فارلند از باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس که از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم تحقیقات تهیه شد، درست شد و روی محیط کشت



شکل ۱: بررسی اثر بازدارندگی گونه های مختلف لاکتوباسیلوس بر روی باکتری اشرشیا کلی به روش انتشار در آگار



شکل ۲: بررسی اثر بازدارندگی گونه های مختلف لاکتوباسیلوس علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به روش انتشار در آگار



شکل ۳: باند ژن خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس ها

شماره ۱: لاکتوباسیلوس پلانتروم، شماره ۲: لاکتوباسیلوس پلانتروم، شماره ۳: لاکتوباسیلوی کنکی، شماره ۴: لاکتوباسیلوس پلانتروم، شماره ۵: لاکتوباسیلوس پلانتروم، شماره ۶: لاکتوباسیلوس نجلی، شماره ۷: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۸: لاکتوباسیلوس مالی، شماره ۹: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۰: لاکتوباسیلوس پنتریس، شماره ۱۱: لاکتوباسیلوس پلانتروم، شماره ۱۲: لاکتوباسیلوس گاستریکوس، شماره ۱۳: لاکتوباسیلوس اجلیس. شماره ۱۴: مارکر. اندازه باندهای تشکیل شده حاصل از PCR، ۵۰۰ bp و ۴۰۰ bp بودند.

جدول ۲- گونه های تشخیص داده شده از تست تخمیر قندها بر اساس جدول Bergry

درصد	تعداد	باکتری
۲۱/۸	۷	لاکتوباسیلوس اجلیس
۱۸/۸	۶	لاکتوباسیلوس پلانتروم
۶/۲۵	۲	لاکتوباسیلوس اینتستینال
۶/۲۵	۲	لاکتوباسیلوس سالیواریوس
۶/۲۵	۲	لاکتوباسیلوس مالی
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس کازئی
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس پستیاکی
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس فروکتیواریانس
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس پروونس
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس اکوئی
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس اسیدیپیسس
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس گاستریکوس
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس کنکی
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس پنتیس
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس نجلی
۳/۱۲۵	۱	لاکتوباسیلوس کورینیفومیس

تعداد کل لاکتوباسیلوس ها: ۳۰

نتایج تست آنتی بیوگرام

طبق نتایج بدست آمده، از میان سویه های جداسازی شده ۲۳ لاکتوباسیلوس دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس بودند (شکل (۱ و ۲)). قطر هاله عدم رشد بیشتر نمونه ها در محدوده نیمه حساس قرار داشت. تنها یک نمونه دارای هاله عدم رشد حدود ۲۲ میلی متر بود و بقیه نمونه ها، هاله عدم رشدی حدود ۱۱ میلی متر را نشان دادند. (۱۱) آنتی بیوگرام نمونه ها در جدول زیر نشان داده شده است:

جدول ۳: میزان حساسیت باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس اورئوس در برابر گونه های مختلف لاکتوباسیلوس توسط روش آنتی بیوگرام

مقاوم	نیمه حساس	حساس	میزان حساسیت
۶-۰	۷-۱۲	۱۳-۱۸	میزان هاله عدم رشد بر حسب میلی متر
۰	۲۳	۹	اشرشیا کلی
۰	۲۴	۸	استافیلوکوکوس اورئوس

قطر هاله عدم رشد بیشتر نمونه ها در محدوده نیمه حساس بودند. در تصویر زیر تنها یک نمونه دارای هاله عدم رشد حدود ۲۲ میلی متر بود و بقیه نمونه ها، هاله عدم رشدی حدود ۱۱ میلی متر را نشان دادند. با مقایسه خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس ها در برابر باکتری های اشرشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس، مشاهده شد که خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس ها علیه اشرشیا کلی، قوی تر است.

بررسی وجود ژن باکتریوسین با روش RCP

برای استخراج AND از کیت استخراج AND استفاده شد، که از شرکت سینا ژن تهیه شد و شامل موارد زیر بود:

Wash Buffer, Lysin Solution, Precipitation Solution, Solven Buffer

بر اساس باندهای تشکیل شده حاصل از ۱۴ PCR نمونه باکتری که با پرایمر اختصاصی باکتریوسین لاکتوباسیلوس ها (Lac KU۱۶۱۱۰۵، ۱)، ۴۱/۶ درصد از باکتری ها دارای باند بودند که نشانه حضور این ژن در باکتری لاکتوباسیلوس است.

ChidrePrabhurajeshwar و همکاران در سال ۲۰۱۷، باکتری‌ها از نمونه‌های کنجد با استفاده از محیط MRS جدا کردند. (۸)

Abd El-Gawad IA و همکاران روی بر خاصیت پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم مطالعه کردند و اثرات مہاری آن را بر روی بسیاری از ارگانیسم‌های بیماریز، از جمله *Salmonella*, *Shigella*, *Colstridium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* و *Campylobacter Jejuni* اثبات کردند. (۱) Astha Nigam و همکاران، لاکتوباسیلوس‌ها را ابتدا از شیر خام، کنجد، گوجه‌فرنگی بر روی MRS آگار جدا سازی کردند. تمام جدایه‌های به دست آمده از لحاظ مورفولوژیکی با ویژگی کلنی جدایه‌های به دست آمده، همراه با واکنش گرمایی و بررسی میکروسکوپی مشخص گردید که گونه‌های زیر بودند: *L. salivarius*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. fermentum* و *L. acidophilus*. (۵)

Nazef L و همکارانش در سال ۲۰۰۸، به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک، از روش‌های رنگ آمیزی گرم، فعالیت کاتالاز و اکسیداز، و تولید اسید از گلوکز استفاده نمودند. (۱۷) در پژوهش حاضر، از تست تخمیر قندی شامل قندهای آرابینوز، تره‌هالوز، ساکاروز، رافینوز، رامنوز، لاکتوز، مانیتول و مالتوز، سوربیتول و زایلوز به منظور شناسایی گونه‌های لاکتوباسیل استفاده شد. از کشت‌های تازه لاکتوباسیل برای تخمیر قندها و تلقیح استفاده شد. بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۷ نمونه ۲۱/۸٪)، لاکتوباسیلوس اجلیس (۶ نمونه ۱۸/۷۵٪) به دست آمد و کمترین فراوانی در لاکتوباسیلانوس کازئی و لاکتوباسیلوس پنتیس بودند. Nazef L و همکارانش در سال ۲۰۰۸، شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک را بر اساس کیت API ۵۰ CH انجام دادند. سپس، بر اساس روش‌های مولکولی rRNA-S ۳۳ و ۱۶ S rRNA ۱۶ سطح جنس و گونه شناسایی شدند. (۱۷)

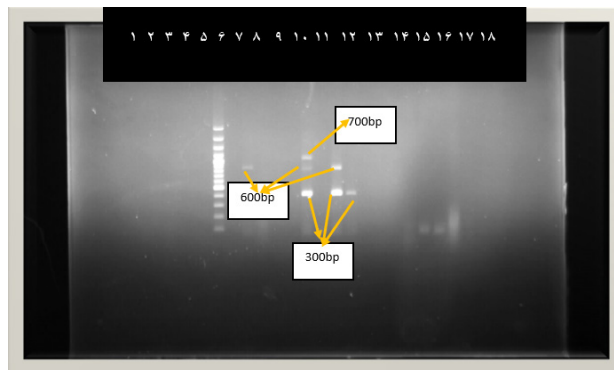
Sarah K و همکاران در سال ۱۹۹۸، روی ژن پلانتاریسین *Lactobacillus plantarum* LPCO۱۰ با استفاده از روش مولکولی PCR استفاده نمودند. (۲۱) BarbaraKarska-Wysocki و همکاران در سال ۲۰۱۰، روی خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متیسیلین بررسی کردند. اثر بازدارندگی رشد توسط فعالیت ضد میکروبی باکتری اسید لاکتیک بر روی سوسپانسیون MRSA بر روی محیط جامد با استفاده از روش‌های انتشار از دیسک و همچنین با استفاده از محیط کشت مایع که شامل مخلوطی از MRSA و کشت باکتری‌های اسید لاکتیک بود، مورد آزمایش قرار دادند. (۶)

نتیجه گیری:

در مطالعه حاضر از ۱۶ مارک متفاوت سویا، ۳۲ سویه لاکتوباسیلوس جدا سازی شد. با استفاده از رنگ آمیزی گرم و تست‌های کاتالاز و اکسیداز از صحت باکتری‌های ایزوله شده اطمینان حاصل شد. برای تشخیص گونه‌های لاکتوباسیلوس‌ها بر اساس کتاب Bergry از تست تخمیر قند‌ها استفاده شد. بیشترین گونه‌های ایزوله شده لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس اجلیس بودند. بعضی از گونه‌های لاکتوباسیلوس خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند.

پیشنهاد میشود مطالعات گسترده تری در زمینه‌های زیر انجام شود:

- ۱) شناسایی خصوصیات ژنتیکی و بیوشیمیایی باکتری‌های تولیدکننده باکتریوسین
- ۲) شناسایی بیشتر اثرات ضد میکروبی و ضد پروتوزوایی و ضد سمی باکتریوسین‌های لاکتوباسیل‌ها.
- ۳) جستجو برای دستکاری ژنتیکی به منظور تولید بیشتر باکتریوسین‌های لاکتوباسیل‌ها.
- ۴) شناسایی اثرات دیگر باکتریوسین‌ها در سلامت انسان و حیوانات.
- ۵) شناسایی اثرات بازدارندگی باکتریوسین‌ها بر روی سایر باکتری‌های بیماری‌زای دخیل در مسمومیت غذایی.



شکل ۴: باند ژن خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اجلیس بر اساس باندهای تشکیل شده از ۱۸ نمونه باکتری در این ژل که با پرایمر اختصاصی باکتریوسین لاکتوباسیلوس اجلیس (M۱۳ CP۰۱۶۷۶۶، ۱) بود، ۲۲/۲ درصد از باکتری‌ها باکتری از نظر حضور ژن مثبت بودند.

شماره ۱: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۲: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۳: لاکتوباسیلوس کنگئی، شماره ۴: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۵: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۶: لاکتوباسیلوس نجلی، شماره ۷: مارکر، شماره ۸: لاکتوباسیلوس مالی، شماره ۹: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۰: لاکتوباسیلوس پنتیس، شماره ۱۱: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۱۲: لاکتوباسیلوس گاستریکوس، شماره ۱۳: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۴: لاکتوباسیلوس کازئی، شماره ۱۵: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۶: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۷: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۱۸: لاکتوباسیلوس سالیاریوس.

با توجه به مارکر، اندازه باندهای مشاهده شده ۳۰۰ bp و ۶۰۰ bp و ۷۰۰ bp بودند.



شکل ۵: باند ژن خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم

شماره ۱: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۲: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۳: لاکتوباسیلوس کنگئی، شماره ۴: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۵: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۶: مارکر، شماره ۷: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۸: لاکتوباسیلوس مالی، شماره ۹: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۰: لاکتوباسیلوس پنتیس، شماره ۱۱: لاکتوباسیلوس پلانتاروم، شماره ۱۲: لاکتوباسیلوس گاستریکوس، شماره ۱۳: لاکتوباسیلوس اجلیس، شماره ۱۴: لاکتوباسیلوس نجلی.

اندازه محصول PCR ژن ۱۰۰۰ bp است. بر اساس باند‌های تشکیل شده از ۱۴ لاکتوباسیلوس در این ژل که با پرایمر اختصاصی لاکتوباسیلوس پلانتاروم (Lfpr CP۰۲۳۷۷۲، ۱) بود، ۲۸/۵ درصد از باکتری‌ها لاکتوباسیلوس‌ها باند ژنی داشتند که نشانه حضور ژن پلانتاریسین در این باکتری‌ها بود.

بحث:

در این مطالعه دریافتیم که دانه‌های سویا دارای لاکتوباسیلوس‌هایی هستند که این لاکتوباسیلوس‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های *اشرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشند.

منابع:

1. Abd EL-Gawed IA, EL-Zeini HM, Hafez SA and Saleh FA. Antibacterial activity of probiotics yoghurt and soy-yoghurt against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. 2016.;10.4172/2155-9600.1000303
2. Agric. J. Nutritional and health benefits of soy proteins. *Food Chem*. 2001. 49 (3), pp 1069–1086.
3. Aleksandra Ołdak, Dorota Zielińska, Anna Rzepkowska, Danuta Kolożyn-Krajewska, “Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese”, *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 6820369, 10 pages, 2017.
4. Anderson JW, Gilliland S.E. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemia humans. *J. AM Coll Nutr*. 1999. 43-50
5. Astha Nigam, Avnish Kumar, Madhusudan HV, Nellam Bhola In. *in vitro* screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against common enteric pathogens. *Journal of Biomedical Sciences*. 2012. No 2-4.
6. Barbara Karska, Wysocki, Mari Bazo, Wando Smorangie Wics. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Elsevier*. 2010. V 165 Issue 8, P 674-686
7. Becton Dickinson and company. BBLTM Litmus Milk. L00746. Rev. 2016.
8. Chidre Prabhurajeshwar, Revanasiddappa, Kelmani Chandrakanth. Probiotic potential of *Lactobacilli* with antagonistic activity against pathogenic strains: An *in vitro* validation for the production of inhibitory substances. *Biomedical Journal*. 2017. Volume 40, Issue 5, October, Pages 270-283
9. Coconnier M.H, Lievin V, Bernet Camard, Hudault. Antibacterial effect of adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain L.B. *American Society for Microbiology*. 2017. pp 1046–1052.
10. Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D et al. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr*. 2001. 386S-392S.
11. Erica Mitchell, What is an antibiogram? 2018.
12. Ezea, I.B., Onyeagu, U, Onyia, C.E. Studies and use of *Lactobacillus* isolates obtained from fermented soybean milk as probiotics international. *Journal of Science and Research (IJSR)*. 2014. Volume 3 Issue 5 pages 1179-1181.
13. Leggett J.E, Gilbert W.A. Magnesium uptake by soybeans. *Plant physiology*. 1969. 44(8) 1182-1186.
14. Maldonado et al. The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2002. Volume 77, Issues 1–2, Pages 117-124
15. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*. 2005; 21(1): p 8–17
16. Michael Chikindas. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2020 Springer Nature Switzerland AG. Part of Springer Nature.
17. Nazef L, Belguesmia Y, Thia A, Prevos H, Drider D. Identification of LAB from poultry feces: Evidence on anti-campylobacter and *Listeria* activities. *J. Poultry Sci*. 2008. 87: 329-334.
18. Patrick McCue, Kalida, Shelly S. Health benefits of soy isoflavonoids and strategies for enhancement. *Food Science and Nutrition*. 2004. Vol 44 Issue 5 pp 361-367.
19. Rea M.C, Alemayehu D, Paul Ross, Hill C. Gut solutions to gut problem bacteriocins probiotics and bacteriophage for control of *Clostridium difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*. 2013. vol 62 pp 1369-1378.
20. Sanae OKADA, Tai UCHIMURA, Naohiro OHARA, Michio KOZAKI, A New Method of Sugar Fermentation Test for Identification of Lactic Acid Bacteria. *Nippon Nōgeikagaku Kaishi* Volume 57 (1983) Issue 3
21. Sarah K. Stephens, Bele N Floriana, Declana P. Cathart et al. Molecular Analysis of the Locus Responsible for Production of Plantaricin S, a Two-Peptide Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. Vol. 64, No. 5. p. 1871–1877
22. Ségolène Dubernet, Nathalie Desmasures, Micheline Guéguen. A PCR-based method for identification of *Lactobacilli* at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 214, Issue 2, September 2002, Pages 271–275,
23. Shin M.S, Han S.K, Ji A.R, Kim K.S, Lee W.K. Isolation and characterization of bacteriocin producing bacteria from gastrointestinal tract for broiler chicken for probiotics. *J. Appl. Micro*. 2008. 2203-2212.