دوفصلنامه علمی ترویجی علوم و فنون زنبورعسل
دوره ۱۵، شماره ۲۸، سال ۱۴۰۳، (۱۰-۱۸)

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک از عسل زنبورعسل کوچک در مناطق جنوبی کشور

سمیه تازه‌کام[۱]، ناصر تاج‌آبادی[۲]، جاماسب نوذری[۳]، یوسف جعفری آهنگری[۴]، محمدهادی محسنی کفشگرکلایی[۱]

۱- دانش آموخته کارشناس ارشد علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر
۲- بخش تحقیقات زنبورعسل، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی، بخش حشره شناسی دانشکده کشاورزی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۴- گروه ژنتیک، اصلاح و فیزیولوژی دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۷/۲۴ **تاریخ پذیرش**: ۱۴۰۳/۲/۳
شناسه دیجیتال (DOI): 10.22034/HBSJ.2024.363814.1149
رایانامه: honey_tazehkam@yahoo.com

چکیده:

امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها در تغذیه انسان، دام و طیور بطور قابل ملاحظه‌ایی در حال افزایش است پروبیوتیک‌ها می‌توانند نقش مهمی در سیستم ایمنی، دستگاه گوارش و دستگاه تنفسی، وظایف و اثر قابل توجهی در کاهش بیماری‌های عفونی بدن ایفا نمایند. شایع‌ترین انواع میکروب‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک، باکتری‌های لاکتیک اسید و بیفیدوباکتری‌ها می‌باشند. از عسل و فرآورده‌های زنبور عسل قرن‌هاست که به منظور شفا و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. متأسفانه اطلاعات در مورد باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در زنبور عسل در حال حاضر اندک است. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس‌های موجود در عسل معده زنبورعسل کوچک بعنوان منبع جدید پروبیوتیک‌ها در ایران بوده است. در مطالعه ی حاضر نمونه‌های زنبورعسل (*Apis florea*) از مناطق جنوبی ایران جمع آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده تا زمان انجام آزمایش در یخچال نگهداری شدند و سپس کشت و جداسازی باکتری‌ها با استفاده

از محیط کشت‌های اختصاصی Mrs broth و Agar انجام گرفت. برای شناسایی باکتری‌ها، تست‌های بیوشیمیایی مانند آزمون کاتالاز و آزمون گرم انجام شد و آن‌هایی که از نظر آزمون کاتالاز، مثبت و از نظر آزمون گرم، منفی بودند حذف گردیدند، سپس DNA کلنی‌های جدا شده استخراج شد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، توالی نوکلئوتیدها مورد بررسی قرار گرفت. پس از توالی سنجی و شناسایی آن‌ها با بکار بردن نرم افزار ژنتیکی Blast، باکتری‌های موجود در عسل شناسایی گردید. نتایج تحقیق نشان داد که ۶ گونه از لاکتوباسیل‌ها در عسل زنبورعسل کوچک وجود دارد و حدود ۲۸/۴ درصد از لاکتوباسیل‌ها بعنوان گونه‌های جدید شناسایی گردیدند که می‌بایست اطلاعات آن‌ها را در بانک ژن ثبت نمود. قالب لاکتوباسیل جدا شده در این تحقیق *Lactobacillus kunkeei* می‌باشد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، زنبورعسل کوچک، عسل

مقدمه

از ۹ گونه زنبورعسل موجود در دنیا، دو گونه *Apis florea* F. و *Apis melifera* L. در ایران وجود دارد. زنبورعسل فلورا کوچکترین گونه زنبورعسل می‌باشد که انتشار آن در قسمت غربی کره زمین از عمان و جنوب ایران شروع می‌شود و تا شرق کره زمین یعنی اندونزی ادامه دارد. مناطق انتشار زنبورعسل کوچک در جهان، کشورهای ایران، عمان، پاکستان، هند، سریلانکا، مالزی، اندونزی، تایلند، سودان، چین و جزیره پاوالان در فیلیپین، میانمار، کامبوج، نپال، عربستان صعودی، ویتنام، بنگلادش و اردن می‌باشد. انتشار این زنبور در ایران از جنوب غربی (استان خوزستان) تا جنوب (استان بوشهر- جنوب فارس) و جنوب شرقی (استان سیستان و بلوچستان) ادامه دارد(عبادی و رحیمی، ۱۳۸۹). این گونه زنبور روشنایی دوست است و قابل نگهداری در کندو نیست. زنبورعسل کوچک فقط یک شان دارد و آن را هم در میان بوته‌ها، زیر سقف ساختمان ها و درختان انبوه گرمسیری می‌سازد. بالای شان یعنی محلی که به شاخه و یا سقف متصل می‌گردد قطورتر بوده و برای ذخیره عسل و گاهی گرده گل مورد استفاده قرار می‌گیرد بنابراین کنترل انسان بر روی این گونه دشوار است و می‌توان گفت انسان هیچگونه کنترلی روی تولید عسل این زنبور ندارد به همین دلیل تاکنون توجه کمی به این گونه شده است(هاشمی، ۱۳۹۳). زنبور عسل کوچک همانند زنبورعسل معمولی نقش بسیار مهمی در گرده‌افشانی باغات مرکبات جنوب و مزارع آن‌ها دارد (عبادی و رحیمی، ۱۳۸۹). از طرف دیگر زنبورعسل برای انسان عسل، موم، بره‌موم، ژله رویال، گرده و زهر تولید می‌کند. عسل غذای اسرار آمیزی است که از زمان‌های قدیم در پزشکی به عنوان دارور مصرف داشته است و به علت داشتن قند زیاد، مواد معدنی و همچنین خاصیت باکتری کشی آن برای پوشش محل جراحی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. عسل برای معالجه زخم‌های سطحی و زخم معده نیز توصیه می شود و بواسطه درمان گلو درد و سایر بیماری‌ها، انسان را متحیر ساخته است((عبادی و رحیمی، ۱۳۸۹). مطالعات اخیر نشان داده که باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک که یکی از معروف‌ترین نوع پروبیوتیک‌ها هستند در عسل و فرآورده‌های زنبورعسل وجود دارند. پروبیوتیک‌ها، نوعی مکمل‌های غذایی هستند که از باکتری‌ها و یا قارچ‌های بالقوه مفید تشکیل شده‌اند. بنابراین با شناسایی این باکتری‌ها می‌توان در آینده نسبت به استفاده از تأثیرات آن‌ها در بهبود تغذیه انسان‌ها و حیوانات بویژه دام، طیور و زنبورعسل اقدام نمود تا موجب ارتقاء بهبود سلامت آنها شد. لذا جهت ارتقاء جایگاه و توجه بیشتر به این زنبور و نظر به ایده جدید جهت موجود بودن باکتری های ا سیدلاکتیک در دو گونه دیگر (ملی فرا و دورساتا)، هدف این تحقیق شناسایی وجود باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک (باکتری‌های پروبیوتیک) در عسل این گونه از زنبور می باشد(تاج آبادی و همکاران، ۱۳۹۰).

مواد و روش

با مراجعه به استان‌های جنوبی کشور (استان فارس شهرستان داراب، استان خوزستان شهرستان دزفول، استان کرمان شهرستان جیرفت و استان سیستان و بلوچستان شهرستان چابهار) از هر یک از شهرستان‌های ذکر شده چهار نمونه عسل جمع آوری گردید و تا شروع انجام آزمایشات در یخچال نگهداری شد. سپس با استفاده از مقدار ۱۰ گرم آگار و ۲۶/۶ گرم MRS broth محیط کشت مورد نظر را تهیه کرده و نمونه‌ها در آن کشت داده شد. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت محیط کشتی که درون انکوباتور قرار داده شده بود مورد بررسی قرار گرفت. پتری‌های حاوی باکتری برای جداسازی مورد استفاده قرار گرفت و تک کلنی‌های مورد نیاز از آنها جدا شد.

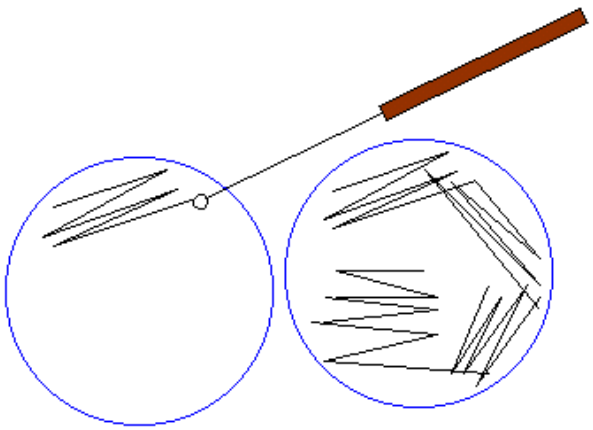
برای کشت نمونه‌ها، ابتدا، ده لوله آزمایش درب‌دار انتخاب شد و در زیر هود در درون یکی از آنها ۹ سی سی آب مقطر استریل و در درون ۹ لوله باقیمانده ۹ سی سی آب مقطر استریل ریخته شد. سپس با سمپلر از ماده آزمایشی (عسل) ۱ سی سی

برداشته و درون لوله آزمایش اولی (یعنی لوله‌ای که حاوی ۹ سی سی آب مقطر استریل بود) ریخته و آن‌را ورتکس کرده تا یک محلول کاملاً یکدست بدست آید. پس از حل شدن کامل عسل و آب مقطر، یک سی سی از این محلول را با سمپلر برداشته به لوله آزمایش دوم منتقل نموده و آنرا نیز ورتکس کرده تا دو محلول در هم حل شوند. سپس از لوله آزمایش دوم، یک سی سی برداشته و به لوله آزمایش سوم انتقال داده شد. این عمل تا لوله آزمایش دهم انجام شد. به این ترتیب ده سری رقت از ماده آزمایشی بدست آمد.

در مرحله بعد از سری‌های رقت ساخته شده بر روی محیط کشتی که قبلاً آماده شده بود کشت داده شد. به این صورت که لوپ سیمی را پس از استریل نمودن درون لوله آزمایش مورد نظر کرده و سپس آنرا بر روی محیط کشت قرار داده و با استفاده از پیپت پاستور که آن‌را به صورت ال شکل می باشد بر روی محیط کشت پخش نموده و در نهایت محیط‌های کشت به درون انکوباتور ۳۷° به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت به صورت برعکس قرار داده شد.

پس از ۷۲ ساعت محیط کشتی که درون انکوباتور قرار داده شده بود مورد بررسی قرار گرفت و تک کلنی‌های مورد نیاز از آنها جدا شد.

برای جداسازی باکتری‌ها و ایجاد تک کلنی لوپ سیمی بر روی شعله استریل شد و در کنار محیط کشت حاوی باکتری قرار داده شد تا سرد شود. آنگاه سر لوپ را به باکتری مورد نظر نزدیک نموده، آن‌را برداشته و بر روی سطح پتری دیگری که تنها حاوی محیط کشت بود، قرار داده شد و بصورت خطوط موازی در چند جهت کشیده شد(شکل ۱).



شکل ۱- نحوه کشیدن لوپ سیمی بر روی محیط کشت

اگر در یک پتری که باکتری در آن وجود دارد، باکتری‌هایی دیده شد که از لحاظ شکل، اندازه، رنگ و . . . با هم فرق داشتند باید تک تک باکتری‌ها را به صورت جداگانه در محیط‌های کشت جداگانه کشت داده تا تک کلنی‌های مورد نظر ایجاد شود. در نهایت پتری‌های کشت شده، در انکوباتور ۳۷ درجه به‌مدت ۲۴ ساعت به‌صورت وارونه قرار داده شد. پس از ایجاد تک کلن، برای اطمینان از وجود لاکتوباسیل‌ها، بر روی آنها تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. توضیح اینکه، تست کاتالاز و تست گرم مثبت، از تست‌هایی هستند که نشان می‌دهند باکتری‌های موجود لاکتوباسیل هستند یا خیر. زیرا لاکتوباسیل‌ها کاتالاز منفی و گرم مثبت می‌باشند. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و جداسازی باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی، DNA آن‌ها با استفاده از کیت مخصوص جداسازی و استخراج گردید. در این آزمایش از کیت بایونیر [1] جهت جداسازی DNA استفاده گردید. برای استفاده از کیت طبق دستورالعملی موجود در بروشور آن استفاده شد.

تست کاتالاز

یک سری از باکتری‌ها قادرند که اکسیژن ۲ ظرفیتی را تبدیل به سوپر اکسید کنند که برای باکتری‌ها حالت سمی دارد. ولی یک تعداد از باکتری‌ها هستند که یک مکانیزم دفاعی بر علیه پراکسید هیدروژن و سوپر اکسید دارند. این‌ها در واقع دارای آنزیمی هستند که می‌توانند این فرم از اکسیژن را مجدداً به فرم دو ظرفیتی تبدیل کنند. از آنزیم‌های مهم که می‌توانند این

1- Bioneer

واکنش را انجام دهد آنزیم کاتالاز است. آنزیم کاتالاز قادر است که آب اکسیژنه را تجزیه کرده و آن را تبدیل به آب و اکسیژن آزاد کند که این آزمایش در صورت مثبت بودن به صورت حباب‌های گاز در روی لام دیده خواهد شد. در این آزمایش با استفاده از لوپ یا خلال دندان استریل، مقدار کمی از باکتری مورد نظر به سطح یک لام خشک و تمیز منتقل داده شدند. بلافاصله یک قطره از پراکسید هیدروژن[2] ۳٪ بر روی کلنی‌های موجود بر روی سطح لام ریخته و از نظر آزاد شدن حباب‌های گاز اکسیژن، لام مورد نظر مورد بررسی قرار گرفت. آزاد شدن حباب‌های گاز نشان دهنده وجود آنزیم کاتالاز در میکروارگانیسم است که موجب شکسته شدن پراکسید هیدروژن به آب و اکسیژن می‌گردد. در آزمایشات صورت گرفته، بیشتر کلنی‌های مورد بررسی از لحاظ وجود کاتالاز منفی بودند و گازی تولید نکردند و تعداد کمی که گاز تولید نمودند حذف گردیدند.

رنگ آمیزی گرم مثبت

در روش رنگ آمیزی گرم از سه رنگ استفاده شد که ۲ تا از این رنگ‌ها نقش مستقیم در رنگ آمیزی دارند و براساس اینکه باکتری‌ها چه رنگی را به خودشان خواهند گرفت می‌توان آن‌ها را به گرم مثبت و گرم منفی دسته بندی کرد. این روش برای اولین بار در سال ۱۸۸۴ توسط کریستین گرند ابداء شد و به مرور زمان یک سری تغییراتی در آن به وجود آمد.

استخراج DNA

پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و جداسازی باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی، DNA آن‌ها با استفاده از کیت مخصوص جداسازی و استخراج گردید. در این آزمایش از کیت بایونیر[3] جهت جداسازی DNA استفاده گردید. برای استفاده از کیت طبق دستورالعملی موجود در بروشور آن استفاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز[4] (PCR)

بی تردید ابداع و معرفی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بیشترین نقش را در توسعه و تکامل نشانگرهای DNA داشته است. این تکنیک در سال ۱۹۸۵ بوسیله Kary Mullis و همکارانش ابداع شد و اکنون کاربردهای نامحدودی در تمامی حوزه‌ها یافته است (Guven, *etal*. 2004). این تکنیک ساده امکان ایجاد رونوشت‌هایی نامحدود از قطعات خاصی از DNA را فراهم می‌نماید. DNAی الگو[5] که PCR روی آن انجام می‌گیرد، می‌تواند DNAی ژنومی (که از گلبولهای سفید خون یا نمونه‌ای از طحال یا هر بافت دیگری استخراج گردیده است) و یا قطعه‌ای از DNA (از هر منبعی) باشد. PCR تقریباً یک میلیون رونوشت از قطعه‌ای کوچک از DNAی الگو ایجاد می‌نماید که این مقدار برای استفاده در هر نوع مطالعه ژنتیکی کافی است. قبل از انجام PCR لازم است ردیف قطعه‌ی که باید تکثیر شود و یا حداقل ردیف هر دو انتهای آن شناسایی گردد((Guven, *etal*. 2004).

شرکت تولیدی و تحقیقاتی

5´-AGG-GTT-TGA-TCC-TGG-CTC-AG-<C>-3´
Melting Temperature 71.5 °C

	2	3	4	5	6	7
Primer Name	OD (1000µl)	MW	pmol	µM in 500µl (Concentration)	The necessary amount of your primer (µl) for preparation of 50µl work stock (10µM)	The volume (µl) that produces 100µM concentration from lyophilized primer
27F	63	8233	229563.95	459.13	1.1	2295.64

شکل ۲- دستورالعمل آماده سازی پرایمر F ۲۷ برای PCR

2- H_2O_2

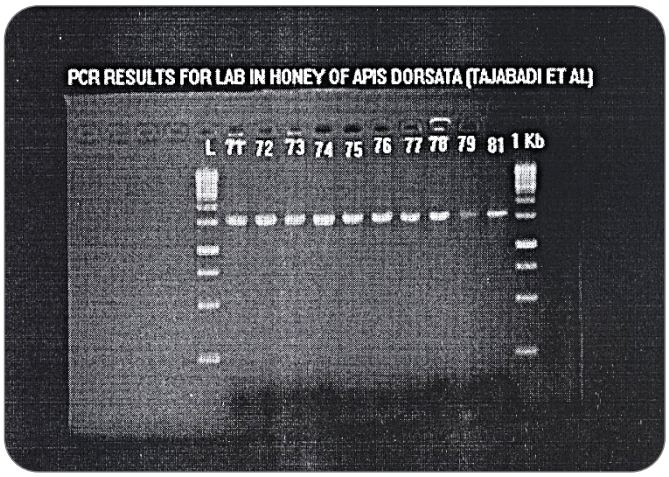
3- Bioneer

4- Polymerase Chain Reaction (PCR)

5- Template DNA

ژل گذاری

قطعات DNA که به وسیله آنزیم‌های محدودکننده تولید می‌شوند بوسیله الکتروفورز بر روی ژل آگاروز از یکدیگر جدا گردیدند. حرکات قطعات DNA بستگی به اندازه آنها دارد. قطعات بزرگ‌تر مسافت کمتری را در ژل طی می‌کنند. بعد از اینکه جداسازی قطعات DNA کامل شد، مولکول‌های DNA به وسیله ماده مناسبی (مانند بروميداتيوم) جهت نمایان شدن نوارهای DNA رنگ‌آمیزی شدند.



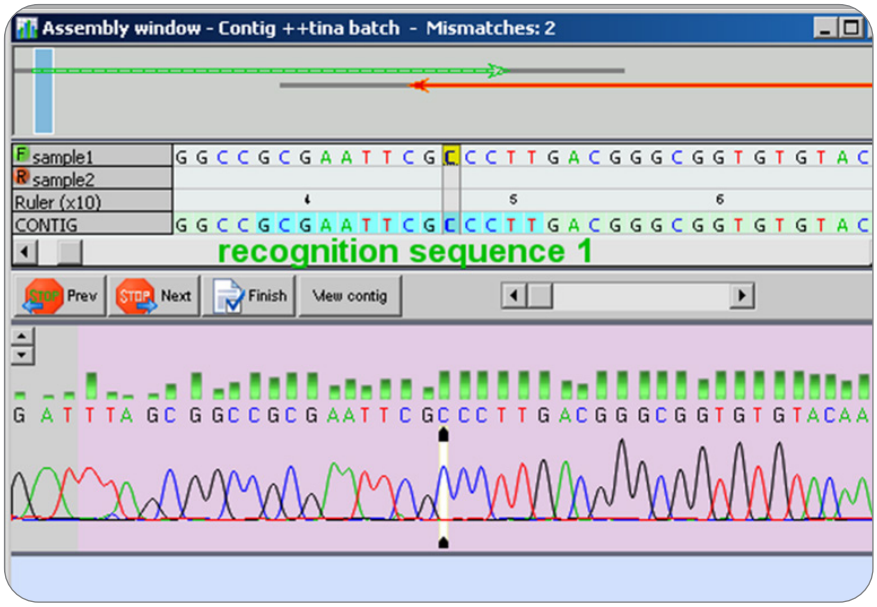
شکل ۳- عکس گرفته شده پس از انجام ژل گذاری (نتایج PCR)

تعیین توالی ژن‌ها(Sequence)

پس از اطمینان از وجود DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توالی سنجی نوکلئوتیدها انجام شد و توالی نوکلئوتیدها مشخص گردید.

شناسایی باکتری با استفاده از نرم افزار Blast

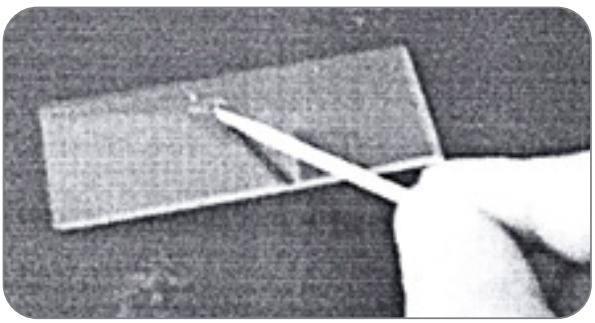
پس از توالی سنجی، نتایج با نرم افزار Blast مورد بررسی قرار گرفت و باکتری‌های موجود شناسایی شدند.



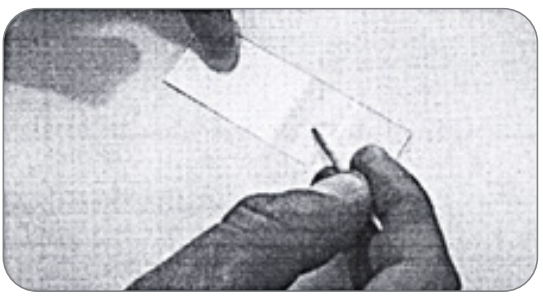
شکل۴- نتایج شناسایی باکتری با نرم افزار Blast

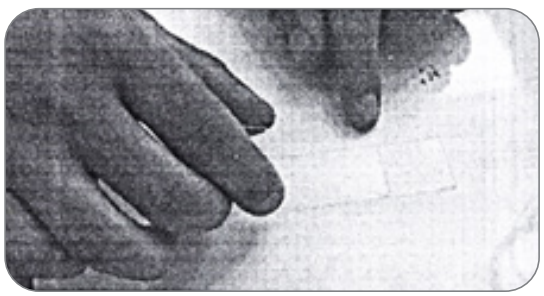
نتایج و بحث

لاکتوباسیل‌ها یکی از مهم‌ترین باکتری‌های موجود در غذا می‌باشند که به صورت پروبیوتیک برای بشر و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعاتی که بر روی این باکتری مفید صورت گرفته نشان داد که باکتری موجود در عسل اثر بسیار مهمی بر روی سلامتی افراد و کسانی که از این محصولات استفاده می‌کنند دارد. در این تحقیق، نمونه‌ها پس از جمع‌آوری ، تا شروع آزمایشات در یخچال نگهداری شد. با استفاده از محیط کشت مخصوص لاکتوباسیل‌ها (MRS broth و Agar)، باکتری‌ها را کشت داده و پس از کشت آنها را خالص نموده تا تک کلن‌های مورد نظر ایجاد گردد. سپس مورد آزمون کاتالاز و گرم قرار گرفتند که در این آزمون از ۶۴ نمونه ۵۴ نمونه کاتالاز منفی و ده نمونه دیگر کاتالاز مثبت بودند. این یافته با نتایج تحقیقات Olofsson و Va´squez در سال ۲۰۰۸ و تاج آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۱ مطابقت داشت.



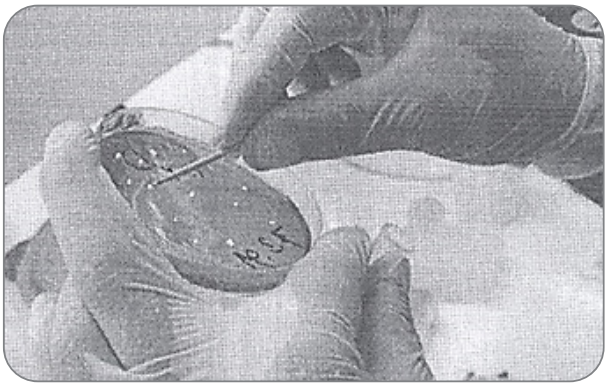
شکل ۵- تست کاتالاز (گذاشتن باکتری با یک خلال دندان استریل بر روی لام و ریختن یک قطره پراکسید هیدوژن بر روی آن





شکل ۶- تست گرم، هم زدن آب مقطر و باکتری / کشیدن لام بر روی لام محتوی آب مقطر و باکتری

پس از آزمون کاتالاز و گرم، با استفاده از کیت Bioneer ، DNA باکتری‌ها استخراج گردید و عمل PCR بر روی آن‌ها انجام گرفت و نتایج آن جهت انجام توالی سنجی به آزمایشگاه ارسال گردید. سپس نتایج آن توسط نرم افزار Blast بررسی و مشخص گردید که باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در عسل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی ایران وجود دارد. این باکتری‌ها شامل (۴۱/۲درصد) *Lactobacillus kunkeei*،(۱/۸ درصد) *L. vermiforme* ، (۱۶/۵درصد) *L.plantarum*، (۷/۹ درصد) *L. pentosus* ، (۰/۸۱ درصد) *L. Fermentum*، (۳/۳۹درصد) *L. alive* و (۲۸/۴درصد) *Lactobacilus sp* می‌باشند. از بین باکتری‌های یاد شده، باکتری *Lactobacilus kunkeei* بیشترین سهم را به خود اختصاص داده است و بعد از آن باکتری *Lactobacilus plantarum* قرار دارد. این نتایج با نتایج Olofsson و Va´squez در سال ۲۰۰۸، Va´squez و همکاران در سال ۲۰۰۹، تاج آبادی و همکاران در سال ۲۰۱۰ ، Ennahar و همکاران در سال ۲۰۰۳ ، Pattabhiramaiah و همکاران در سال ۲۰۱۲ و Killer و همکاران در سال ۲۰۱۰ ، مطابقت دارد.



شکل ۷- استخراج DNA با استفاده از کیت: برداشت باکتری و انتقال آن به میکروتیوپ

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در عسل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جنوبی ایران وجود دارد. این باکتری‌ها شامل *Lactobacilus kunkeei*، *L. vermiforme* ، *L.plantarum*، *L. pentosus* ، *L. Fermentum*، *L. alive* و *Lactobacilus sp* می‌باشند. دوگونه *L. pentosus* و *L.plantarum* از نظر ساختار ژنتیکی کاملاً مشابه می‌باشند. از بین باکتری‌های یاد شده، باکتری *Lactobacilus kunkeei* با ۴۱/۲درصد بیشترین سهم را به خود اختصاص داده است و بعد از آن باکتری *Lactobacilus plantarum* با فراوانی ۱۶/۵ درصد در رتبه بعدی قرار دارد. باکتری *pentosus* دارای فراوانی ۷/۹ درصد، باکتری *L. alive*، ۳.۳۹ درصد، *L.vermiforme*، ۱/۸ درصد و باکتری *L. Fermentum* دارای فراوانی ۰/۸۱ درصد می‌باشد. ۲۸/۴ درصد از باکتری‌های مورد بررسی باکتری‌های جدید می‌باشند که در این تحقیق با نام *Lactobacilus sp* یاد گردیدند و می‌بایست اطلاعات آن‌ها در بانک ژن ثبت گردد. تعدادی از این باکتری‌ها شباهت بسیار زیادی به باکتری *Lactobacilus kunkeei* داشتند و تعداد دیگری تا ۷۵ درصد به باکتری *vermiforme* شباهت داشتند. به طور کلی نتایج تحقیق نشان داد که ۶گونه از لاکتوباسیل‌ها در عسل زنبورعسل کوچک وجود دارد و حدود ۲۸/۴ درصد از لاکتوباسیل‌ها بعنوان گونه‌های جدید شناسایی گردیدند که می‌بایست اطلاعات آن‌ها را در بانک ژن ثبت نمود. قالب لاکتوباسیل جدا شده در این تحقیق *Lactobacillus kunkeei* می‌باشد.

پیشنهادات

با توجه به نتایج این مطالعه، پیشنهادات زیر ارائه می‌شود:

۱. باتوجه به نتایج تحقیق و وجود باکتری‌های لاکتوباسیل در نمونه‌های عسل زنبوران کوچک و باتوجه به اینکه لاکتوباسیل-ها یکی از باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند بنابراین پیشنهاد می‌گرد با انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه، از ویژگی‌های پروبیوتیکی این باکتری‌ها در بهبود تغذیه انسان‌ها و حیوانات اهلی بویژه دام، طیور و زنبورعسل استفاده نمود تا به بهبود سطح سلامت جامعه کمک گردد.

۲. برای استفاده تجاری از لاکتوباسیل‌ها پیشنهاد می‌شود، در تحقیقات آینده، بعضی از لاکتوباسیل‌ها از سایر باکتری‌ها جدا شوند تا استفاده تجاری از آنها امکان‌پذیر شود. برای انجام این کار، اطلاعات بیشتر در مورد باکتری‌ها خصوصاً لاکتوباسیل‌ها مورد نیاز است.

منبع ها:

۱. آمارنامه سازمان جهادکشاورزی، معاونت امور تولیدات دامی وزارت جهادکشاورزی. ۱۳۹۰.

۲. تاج آبادی، ن.، مردان، م.، عبد مناف، م.ی.، مصطفی، ش.، هاشمی، ر. و صابریون، م.م. ۱۳۹۰. شناسایی باکتری‌های جدید پروبیوتیک در عسل معده زنبورعسل بزرگ (*Apis dorsata*) در شمال کشور مالزی. خلاصه مقالات هفتمین سمینار پژوهشی زنبورعسل کشور. انتشارات دفتر تکنولوژی خدمات آموزشی. ص ۱۷-۱۵.

۳. خاک سفیدی، ا. ۱۳۸۰. مقایسه اثر پروبیوتیک و آنتی بیوتیک بر عملکرد سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی. پایان نامه فوق لیسانس. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس.

۴. رشیدی‌قادر، ف. ۱۳۷۲. پروبیوتیک به عنوان جایگزینی برای آنتی بیوتیک. پژوهش و سازندگی. شماره ۱۹. ص۶۷-۶۱.

۵. عبادی، ر و احمدی، ع.ا. ۱۳۸۹. پرورش زنبورعسل. انتشارات ارکان دانش. چاپ پنجم.

۶. مهدی‌زاده، س.م.، لطف الهیان، ه.، حسینی، ع.، میرهادی، ا. و میرعبدالباقی، ژ. ۱۳۸۹. اثرات سطوح مختلف پروبیوتیک در جیره بر عملکرد جوجه‌های گوشتی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. انتشارات مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور. ص ۱۵-۵.

۷. صمدی، ع و پاسالار، پ. ۱۳۷۶. ژنتیک مولکولی. مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. جلد دوم. صفحه ۵۷-۵۴.

۸. هاشمی، مسعود (۱۳۹۳). راهنمای کامل پرورش زنبور عسل. نشر فرهنگ جام تهران.

1. Ennahar, S., Yamin Cai and Yasihito F. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 69(1):444-451.

2. Killer, J., Kopec, J., Mra´zek, J., Rada V., Dubna´, S. and Marounek, M. (2010). Bifidobacteria in the digestive tract of bumblebees. Journal of Anaerobe. 166-170.

3. Olofsson, T.C. and Vasquez, A. (2008) Detection and identification of a novel lactic acid bacterial Flora within the honey stomach of the honeybee Apis mellifera. Journal of Curr Microbiol. 57: 356-363.

4. Pattabhiramaiah, M., Reddy, M.S. and Brueckner, D. (2012). Detection of novel probiotic bacterium Lactobacillus spp. in the workers of Indian honeybee, Apis cerana indica. International journal of Enviornment Science 2(3): 1135-1143.

5. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M.Y., Shuhaimi, M., Meimandipour, A. and Leyla Nateghi. (2011). Detection and identification of novel potential probiotics bacteria of Lactobacillus found in the honey stomach of the Giant honeybee Apis dorsata. Journal of Apidologie 42 (5): 642-649.

6. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M.Y., Shuhaimi, M. (2011). Isolation and identification of Enterococcus sp. from Honey stomach of honeybee based on biochemical and 16S rRNA sequencing analysis. International journal of Probiotic and perbiotic. 6 (2): 95-100.

7. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M.Y., Shuhaimi, M., Javanmard, A. and Meimandipour, A. (2009). Isolation, characterization and identification of Lactobacillus bacteria from honey stomach of honeybee Apis dorsata in Kedah of Malaysia. International Congress of Malaysian Society for Microbiology (ICMSM), Penang, Malaysia: 228.

8. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, M.Y., Shuhaimi, M. and Javanmard, A. (2010). Detection and identification of a new potential probiotics bacteria from honey of the giant honeybee Apis dorsata in highland of Malaysia. Journal of ApiProduct and ApiMedical Science 2(1): 46.

9. Tajabadi, N., Mardan, M., Shuhaimi, M., Abdul Manap, M.Y. and Feizabadi, F. (2011). Weissella sp.Taj-Apis., a Novel lactic acid bacterium isolated from honey, First Iranian conferences, Kuala Lumpur, Malaysia: 100.

10. Tajabadi, N., Mardan, M., Abdul Manap, MY., Shuhaimi, M., Hashemi, S.R. and Saberioon. M.M. (2011). Novel potential probiotic bacteria found in honey stomach of giant honeybee (Apis dorsata) In Northein Malaysia, 7th Iranian Honeybee seminar. Karaj, Iran.

11. Vasquez, A., Olofsson, T.C., Sammataro, D. (2008) A scientific note on the lactic acid bacterial flora in honeybees in the USA- A comparison with bees from Sweden. Journal of Apidologie. 40: 26-28

Isolation and identification of lactic acid producing bacteria from small honey bee in southern regions of the country

Somayeh tazehkam[1], Naser Tajabadi[2], Jamasb Nozari[3], Yoseph Jafari Ahangari[4], Mohammad Hadi Mohseni Kafshgarkolaee[1]

1- Master's degree in animal science, Islamic Azad University, Qaimshahr branch
2. Department of Honey Bee, Animal Science Research Institute of Iran, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3. Associate Professor, Department of Botany, Department of Entomology, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
4. Department of Genetics, Breeding and Physiology of Animal and Poultry, Faculty of Animal Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

DOI: 10.22034/HBSJ.2024.363814.1149

Abstract

Probiotic bacteria are becoming increasingly important in the content of human nutrition. Nowadays, probiotics are being increasingly promoted worldwide, with suggestions that probiotics can play an important role in immunological, digestive, and respiratory functions and could have a significant effect in alleviating infectious disease. Lactic acid bacteria and *bifidobacteria* are the most common types of microbes used as probiotics. Honey and bee products have been used in healing for centuries. Unfortunately, information about probiotics bacteria in local honeybee is not currently available and scant. Thus, the aim of this study was to isolate and identify the predominant *Lactobacillus* as probiotic from the honey stomach of *Apis florea* in the Iran.

Samples of honeybee were collected from *Apis florea* colonies from Iran. Samples were preserved in fridge till test starts. *Lactobacillus* bacteria are isolated from honey stomach using MRS broth and agar medium. The isolates were Gram-stained and tested for Catalase reaction. Then DNA extracted of bacterial colonies amplified with PCR using *lactobacilli* primers. After sequencing, all bacterial gene identified by using Blast software.

DNA from all *lactobacillus* in the honey were exhibited to be catalase negative, gram positive and the other with catalase positive and gram negative were eliminated.

6 new strain/ species of *Lactobacillus* bacteria were identified from honey stomach in different colonies of *A. florea* and almost 28.4% of them identified as new species and candidate to register in NCBI.

Most of them are *Lactobacillus kunkeei*. *Lactobacillus* in the honey stomach may have the potential to promote human performance and health.

Key words: Probiotic-Lactobacillus-small honey bee-Honey

Corresponding Author: Somayeh tazehkam
Email: Honey_tazehkam@yahoo.com