Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال دوازدهم ـ شماره سوم ـ مرداد- شهریور ۱۳۸٤
www.magiran.com/jasnr

جداسازی، شناسایی و بررسی چگونگی توزیع نژادهای بیفید و باکتریوم در برخی از افراد ایرانی

مرتضی خمیری[1]، حمید بهادر قدوسی[2]، سیدعلی مرتضوی[2]، علی خامسان[3]، درخشان احمد[2] و فخری‌شهیدی[4]

[1]دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی و عضو هیأت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [2]عضو هیأت علمی دانشگاه فردوسی مشهد، [3]مدیر آزمایشگاه‌های شرکت Actilab در مونترال کانادا، [4]عضو هیأت علمی انیستیتو ملی علمی و تحقیقات (INRS) کانادا در مونترال

تاریخ دریافت: ۸۲/۱۲/٦ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۰/۲

چکیده

هدف از این تحقیق بررسی پراکندگی گونه‌های مختلف بیفیدوباکتریوم‌ها و تعیین گونه‌های برتر بود که بیشترین توزیع آنها در بین تعدادی از افراد ایرانی می‌باشد. برای این کار از نمونه‌های مدفوع افراد استفاده شد. با بررسی هزاران کلنی رشد یافته برروی محیط بیرنز، ۵۰ سویه بیفیدوباکتریوم از ۹۰ نفر در چهار گروه سنی جدا شد. ۷۰ درصد نمونه‌های آزمایش شده دارای یفیدوباکتریوم بوده است. خصوصیات فیزیولوژی و بیوشیمیایی این باکتری‌ها با استفاده از تست‌های مرفولوژیک، بیوشیمیایی و آنزیمی بررسی گردید. ٦۲ درصد از باکتری‌های بررسی شده به‌عنوان بیفیدوباکتریوم لانگوم، ۲۲ درصد بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و۲ درصد بیفیدوباکتریوم کتنولاتوم شناسایی شدند. ١٤ درصد از این باکتری‌ها از نظر الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها مشابه هیچیک از بیفیدوباکتریوم‌های شناخته شده نیستند و برای اولین بار گزارش می‌شوند. نتایج نشان می‌دهد که بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بیشترین فراوانی را در بین گونه‌های ایرانی دارا می‌باشند و براین اساس برای تهیه فرآورده‌های لبنی حاوی بیفیدوباکتریوم، استارترهای واجد این گونه‌ها پیشنهاد شده است.

واژه‌های کلیدی: بیفیدوباکتریوم، پروبایوتیک، سویه‌های ایرانی، جداسازی و شناسایی

مقدمه

بیفیدوباکتریوم[1] باکتری گرم مثبت، بدون اسپور، بی‌هوازی و با اشکال میله‌ای غیرمنظم است. اغلب به شکل Y (دارای سری دو شاخه[2]) یا سرهای چماقی دیده می‌شوند. بیفیدوباکتریوم بومی روده انسان‌ها و حیوانات سالم می‌باشد (اسکاردوی، ۱۹۸٦؛ اسگرباتی و همکاران، ۱۹۹۵). از مجموع ۳۳ گونه شناخته شده ۱۲ گونه آن منشأ انسانی داشته که ۹ گونه آن بومی روده، ۳ گونه دیگر بومی دهان و دندان‌ها است. برخی از بیفیدوباکتریوم‌ها علاوه بر روده بومی واژن نیز می‌باشند. ۲۱ گونه باقی مانده در شیرهای تخمیری، مجاری گوارشی حیوانات مختلف، زنبور عسل، فاضلاب‌ها و گوارنده‌های بی‌هوازی دیده شده‌اند (فریدریک، ۱۹۹۷؛ روکیا و همکاران، ۲۰۰۰).

بیفیدوباکتریوم‌ها در حفظ سلامت عمومی بدن نقش فوق‌العاده مهمی دارند. چون با تولید اسیداستیک و اسیدلاکتیک و کنترل pH روده بزرگ مانع از رشد

1 -Bifid obacterium
2 -Bifid form

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌های مضر (مانند کلستریدیوم پرفرینجنس) می‌شوند (گیبسون و همکاران، ۱۹۹٤؛ گیبسون و همکاران، ۱۹۹۵؛ میتسوکا، ۱۹۸٤). علاوه‌بر این اثرات مفید دیگری از بیفیدو باکتریوم‌ها گزارش شده است که عبارتند از: جلوگیری از بروز اسهال یا کاهش آن (دیوید و همکاران، ۱۹۹۹)، تخفیف اثرات عدم تحمل لاکتوز (فوکس و همکاران، ۱۹۹۹)، کاهش میزان کلسترول (راسیک و همکاران، ۱۹۹۲؛ کلاور و همکاران،۱۹۹۳؛ پریرا و همکاران، ۲۰۰۲)، فعالیت ضد میکروبی (اروناچلام، ۱۹۹۹؛ گیبسون و همکاران، ۱۹۹٤)، فعال‌سازی سیستم ایمنی بدن (فوکوشیما و همکاران، ۱۹۹۸؛ میتسوکا، ۱۹۹۲)، تخفیف یبوست (اوسالیوان و همکاران، ۱۹۹۸)، کاهش ترکیبات سرطانی (سینگ، ۱۹۹۷) و تولید ویتامین (اپاژالتی و همکاران، ۲۰۰۳؛ روکیا و همکاران، ۱۹۸۳). وجود بیفیدوباکتریوم‌ها در روده نمایانگر سلامت فرد است. برخی عوامل که ممکن است موجب کاهش جمعیت این باکتری‌ها در روده شوند عبارتند از: اختلال در حرکات دودی روده، عمل جراحی معده و یا روده کوچک، بیماری‌های کبد یا کلیه، کم خونی خطرناک، سرطان، درمان با اشعه یا آنتی بیوتیک، اختلالات در سیستم ایمنی، فشارهای روحی، تغذیه نامناسب و پیری (لامبرت و همکاران، ۱۹۹٦؛ میتسوکا، ۱۹۹۰؛ میتسوکا، ۱۹۹٦). بنابراین باید با اتخاذ روشی مناسب جمعیت این گروه از باکتری‌ها را در روده افزایش داد. پیشنهاد شده است که با مصرف دهانی بیفیدوباکتریوم‌ها و افزایش جمعیت آنها در روده می‌توان از فواید این باکتری بهره‌مند شد (بنو و همکاران، ۱۹۹۲؛ دیوید و همکاران، ۱۹۹۹؛ تامودا و همکاران، ۱۹۹۱).

بیفیدوباکتریوم و برخی از لاکتیک اسید باکتری‌ها (مانند لاکتوباسیلوس‌ها) به‌عنوان پروبایوتیک شناخته می‌شوند. پروبایوتیک کلمه‌ای یونانی و به‌معنی "برای زندگی" می‌باشد. در دهه گذشته علاوه‌بر تحقیقات گسترده‌ای که برای شناسایی و شناخت ابعاد کاربردی مختلف این گروه از باکتری‌ها صورت گرفته است، با استفاده آنها در صنعت غذا فرآورده های مختلفی تهیه و تولید گردید (بارن و همکاران، ۲۰۰۱؛ گوبتی و همکاران، ۱۹۹۸؛ گف و همکاران، ۱۹۹٦؛ راسیک و همکاران، ۱۹۹۰؛ ری، ۲۰۰۱؛ اسکاردوی، ۱۹۸٦).

با توجه به اینکه صنایع لبنی ایران در صدد بکارگیری استارترهای پروبایوتیک در فرآورده‌های تولیدی خود است لذا ضرورت دستیابی به اطلاعاتی در خصوص چگونگی توزیع جمعیت بیفیدوباکتریوم‌ها انگیزه‌ای شد تا برای اولین بار در ایران این باکتری از گروه محدودی از مردم شهر مشهد جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی شود که صنایع لبنی را در انتخاب استارترهای بیفیدی پروبایوتیک کمک خواهد نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و خالص‌سازی بیفیدوباکتریوم‌ها: نمونه‌های مدفوعی مورد آزمایش در آزمایشگاه تشخیص طبی پاسارگاد مشهد از افراد داوطلب که سابقه بیماری حاد روده‌ای و مصرف آنتی بیوتیک به مدت ٦ ماه نداشته‌اند جمع‌آوری گردید. نمونه‌های مدفوع در ظروف پلاستیکی مخصوص تحویل آزمایشگاه شد. پس از رقیق‌سازی ۱ گرم از نمونه در ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی حاوی پپتون ۱g/l، L- سیستئین-HCl (مرک، آلمان) ۰/۵g/l و NaCl ۸ g/l (مرک، آلمان)، یک لوپ از سوسپانسیون حاصل برروی محیط کشت بیرنز[1] (بیرنز، ۱۹۹۰) به صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵-۳ روز در جارهای بی‌هوازی حاوی Gas Pak (۱۰ درصد H_2، ۱۰ درصد CO_2 و ۸۰ درصد N_2 - مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری شد. برای کنترل شرایط داخلی جار از نوارهای آغشته به متیلن بلو اکسید شده (مرک، آلمان) استفاده گردید (هارتمینک و همکاران، ۱۹۹۹).

برای بررسی حضور بیفیدوباکتریوم‌ها و جدا کردن آنها از روی هر پلیت بسته به تعداد کلنی‌های ظاهر شده

1-Beerens Medium

www.SID.ir

Archive of SID

حدود ۱۰ تا ۲۰ کلنی بررسی میکروسکوپی (۱۰۰۰×، الیمپوس[1]، ژاپن) شدند و همهٔ آنها که دارای اشکال شاخص بیفیدوباکتریوم‌ها (باکتری‌هایی با اشکال شاخه دار، یا اشکالی مانند Y وV، برخی نیز با سرهای برجسته و گرم مثبت) جدا شدند. برای خالص‌سازی و تأیید شکل روی محیط TPY Agar (تریپتوکیز، پپتون و عصاره مخمر (مرک، آلمان)) حاوی L- سیستئین- HCl (مرک، آلمان) کشت شدند. برای اطمینان از رسیدن به خلوص کامل کلنی‌های انتخاب شده ۲ تا ۳ بار روی محیط جامد TPY[2] حاوی L- سیستئین- HCl کشت داده شدند. برای نگهداری کوتاه مدت باکتری‌های خالص شده جهت انجام آزمایش‌های بعدی، از محیط نیمه جامد TPY حاوی L- سیستئین- HCl استفاده گردید. برای نگهداری طولانی مدت، باکتری‌های تأیید شده لیوفیلیزه شدند. برای لیوفیلیزاسیون ابتدا هر باکتری در لوله‌ای دارای ۱۰ml محیط MRS (مرک، آلمان) مایع حاوی L- سیستئین- HCl تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲٤ ساعت کشت شد. پس از حصول کدورت لازم لوله‌های واجد کشت فعال با سرعت ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. بعد از دور ریختن مایع بالایی، با افزودن ۱۰ml از سرم فیزیولوژی حاوی پپتون و L- سیستئین – هیدروکلراید به سلول‌های رسوب داده شده ۲ بار شستشو و سانتریفوژ (شرکت هیروس[3]، مدل لب فیوژ ۲۰۰، آلمان) شدند. در نهایت سوسپانسیونی از سلول‌های باکتریایی شستشو شده با حجمی مساوی از محلول حاوی ۲۰ درصد شیر خشک بدون چربی و ۵ درصد ساکارز تهیه گردید (اندروس، ۱۹۹۲). سوسپانسیون تهیه شده به لوله‌های شیشه‌ای با در پوش پیچی منتقل و به سرعت منجمد گردید. سپس سوسپانسیون منجمد شده باکتریایی در دستگاه فریز درایر (شرکت لبکون[4]، مدل فریزون ۱۲، ایتالیا) خشک گردید.

1-Olympus
2-Trypticase Peptone Yeast agar
3-Hereaus
4-Labcon

خصوصیات بیوشیمیایی و آنزیمی

الف- تخمیر قندها: ابتدا باکتری‌ها در محیط مایع Modified MRS (ری و همکاران، ۱۹۹۰) حاوی گلوکز کشت شده پس از ۲٤ ساعت لوله های واجد کشت فعال با سرعت ۵۰۰۰m rp به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و با استفاده از بافر فسفات پپتونه سیستئین دار ۲ بار شستشو گردیدند. پس از تهیه سوسپانسیونی با استفاده از رسوب میکروبی در همان بافر با غلظت معادل محلول مک فارلند شماره ۲، ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون میکروبی به محیط Modified MRS واجد کربوهیدرات‌های مورد آزمایش افزوده شد. تغییر رنگ از قرمز به زرد پس از اینکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸- ۲٤ ساعت در شرایط بی‌هوازی بررسی گردید (ری و همکاران، ۱۹۹۰؛ اسکاردوی، ۱۹۸٦).

ب- آزمایش‌های آنزیمی

تعیین آنزیم فروکتوز فسفات فسفوکتولاز (F٦PPK): این آزمایش بطور خلاصه طی مراحل زیر انجام شد. کشت در ۱۰ml محیط مایع TPY، جداسازی سلول‌های رشد کرده پس از ٤ روز گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی با استفاده از سانتریفوژ در ۵۰۰۰rpm دور بمدت ۱۵ دقیقه، دوبار شستشوی سلول‌های برداشت شده از محیط TPY در محلول بافر فسفات، سوسپانسیون مجدد در ۱ml از همان بافر، شکستن این سلول‌ها با استفاده از دستگاه سونیکاتور (شرکت فیشر[5]، مدل سونیک ۳۰۰، امریکا) به مدت ۲۰ دقیقه در یک حمام یخ، افزودن ۰/۲۵ ml از هر یک از معرف‌های نوع ۲ و۳ به سلول‌های خرد شده، گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ دقیقه، افزودن ۱/۵ ml از محلول ٤، و استراحت بمدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، افزودن ۱ml از هر یک از معرف‌های ۵ و ٦ و استراحت محلول بمدت ۵ دقیقه در دمای اتاق،

5-Fisher

www.SID.ir

Archive of SID

افزودن ۱ml میلی‌لیتر از محلول رنگی ۷، تشکیل جلای رنگی قرمز- قهوه‌ای استیل فسفات از فروکتوز ٦- فسفات دلیل بر مثبت بودن حضور آنزیم F٦PPK است (شوالیر و همکاران، ۱۹۹۰؛ اسکاردوی، ۱۹۸٦). معرف‌های این آزمایش عبارتند از:

۱- بافر فسفات mol/l ۰,۰۵ ، ٦,۵ pH، حاوی L- سیستئین – هیدروکلراید mg/l ۵۰۰

۲- NaF، ٦mg/ml و سدیم استات ۱۰ mg/ml

۳- فروکتوز ٦- فسفات (ملح سدیم، با خلوص ۹۸ درصد)

٤- هیدروکسیل آمین- هیدروکلراید ۱۳۹mg/ml

۵- تری کلرواستیک اسید ، ۱۵ درصد در آب

٦- هیدروکلریک اسید ٤mol/l

۷- $FeCl^3$، ٦ آبه ، ۰,۵ درصد (وزنی/ حجمی) در هیدروکلریک اسید ۰,۱mol/l

سایر آزمون‌های تکمیلی: برای شناسایی باکتری‌های جدا شده از آزمایش‌های دیگری نیز استفاده شد که عبارت بودند از: احیای نیترات، تست کاتالاز، تست ایندول، بررسی توانایی هیدرولیز ژلاتین و بررسی توانایی رشد در شرایط هوازی (اندروس، ۱۹۹۲؛ بارن، ۱۹۹۰)

آنالیز آماری: نتایج در یک جدول ۲×۲ با در نظر گرفتن دو گروه اصلی مورد آزمایش و مثبت یا منفی بودن حضور بیفیدوباکتریوم‌ها براساس آزمون کای اسکوئر مقایسه و آزمون شدند. فرض H° حضور بیفیدوباکتریوم‌ها در بدن را تابعی از گروه سنی نمی‌داند. بنابراین این فرض تحت آزمون کای اسکوئر بررسی شد (اسندکور و ککران، ۱۹۸۹).

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و نمونه‌ها: جداسازی و خالص کردن بیفیدوباکتریوم‌ها با استفاده از روش‌های کشت دادن کاری بسیار پر مشقت و طاقت فرساست. بخصوص با توجه به ویژگی‌های خاص بیفیدوباکتریوم‌ها از جمله نیاز به شرایط سخت بی‌هوازی و تجهیزات ویژه این امر دشوارتر می‌گردد. علاوه‌بر این، انتخاب یک محیط کشت مناسب که قادر باشد از بین فلور میکروبی مدفوع، بیفیدوباکتریوم‌ها را جدا کند امر ساده‌ای نیست. اما محیط کشت بیرنز از جمله محیط کشت‌هایی است که تا کنون به‌عنوان محیطی مناسب برای جداسازی بیفیدوباکتریوم‌ها از مدفوع استفاده شده است (اپاژالتی و همکاران، ۲۰۰۳؛ هارتمینک و همکاران، ۱۹۹۹؛ سیلوی، ۱۹۹٦). این محیط ضمن دارا بودن ترکیبات اختصاصی، یکی از ویژگی‌های منحصر بفردش سهولت تهیه آن می‌باشد (بیرنز، ۱۹۹۰).

بررسی میکروسکوپی مجدد پس از کشت برروی محیط TPY نشان داد که معمولاً سلول‌های کشت شده برروی این محیط دارای خصوصیات بیفیدی (حالت دو شاخه Y یا V شکل) بیشتری بودند. پیشتر نیز توصیه شده بود برای مشاهده شکل تیپیک (اصلی) بیفیدوباکتریوم‌ها از این محیط استفاده شود (اسکار - دوی، ۱۹۸٦).

در این تحقیق از چهار گروه نمونه‌برداری شد گروه اول شیرخوران زیر ۲ سال، گروه دوم بچه‌ها و جوانان ۲ تا ۱۸ سال، گروه سوم بزرگسالان ۱۸ تا ٦۰ سال و گروه چهارم افراد مسن بالای ٦۰ سال. با توجه به اینکه نمونه‌برداری از شیرخوران امر مشکلی است و از طرفی از افراد مسن نیز داوطلب چندانی وجود نداشت لذا تعداد نمونه از این دو گروه بسیار کم و بترتیب ۵ و ۲ نفر بوده است. اما در گروه‌های دوم و سوم بترتیب از ۵۰ و ۲۸ نفر نمونه‌گیری شد. بنابراین نگاه اصلی این پژوهش به گروه‌های سنی ۲ تا ٦۰ سال بوده است. ویژگی‌های مربوط به ۵ نمونه نیز مشخص نشد (در جدول ۱ رائه نشده است). علی‌رغم اینکه سعی شد تا از افرادی نمونه‌برداری شود که دارای سابقه سلامتی مناسبی باشند و از حدود ٦ ماه قبل از نمونه‌برداری آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده باشند، با این وجود تعدادی از افراد داوطلب با ناراحتی خفیف روده‌ای نیز در این طرح شرکت کردند لذا با توجه به سابقه بیماری افراد، ۳۰ درصد از افرادی که از مدفوع آنها *بیفیدوباکتریوم‌ها* جدا نشد دچار دردهای

www.SID.ir

Archive of SID

خفیف شکمی بوده‌اند (نتایج ارائه نشده است). گرچه در دو گروه اول و چهارم تعداد نمونه‌ها کافی نبود اما از ۵ نمونه گروه اول ٤ نمونه حاوی سلول‌های بیفیدی بودند و از دو نمونه گروه چهارم هیچ سلول بیفید شکلی جدا نشد. اگرچه تعداد نمونه در این گروه کم است و نمی‌توان نتیجه مستدلی از آن بیان نمود اما دیگران نیز کاهش تعداد *بیفیدوباکتریوم*ها در بزرگسالان را گزارش نمودند یکی از دلایل کاهش *بیفیدوباکتریوم*ها در بزرگسالان کاهش قدرت اتصال این باکتری‌ها به موکوس روده ذکر شده است (اویهند و همکاران، ۱۹۹۹). در نمونه‌های گروه دوم و سوم بترتیب از ۳۷ نمونه (٧٤ درصد) و از ١٦ نمونه (۵۷ درصد) سلول‌های بیفید شکل جدا گردید (جدول ۱). برخی از نمونه‌ها واجد بیش از یک فرم بیفید بوده‌اند.

براساس آزمون انجام شده با کای اسکوئر، چون مقدار کای اسکوئر محاسبه شده بزرگتر از کای اسکوئر جدول با یک درجه آزادی (X^2=۳/۸٤) است نتایج حاصل در سطح ۵ درصد معنی‌دار است و بنابراین دلیل کافی برای رد فرض H° وجود دارد. در نتیجه می‌توان استنباط نمود که با توجه به نتایج این مطالعه پراکندگی تعداد بیفیدوباکتریوم تابعی از گروه‌های سنی است.

همانطور که در جدول ۱ دیده می‌شود متوسط افرادی که *بیفیدوباکتریوم*ها از مدفوع آنها جدا شده است حدود ۷۰ درصد است. *بیفیدوباکتریوم*ها در همه نمونه‌های مدفوعی افراد سالم یافت می‌شوند (هارتمینک و همکاران، ۱۹۹۹؛ اسگرباتی و همکاران، ۱۹۹۵) اما با توجه به اینکه در این تحقیق از نمونه مدفوعی افرادی استفاده شد که به آزمایشگاه تشخیص طبی مراجعه می‌کردند. طبیعتاً انتظار این است که تعدادی از نمونه‌ها مربوط به افرادی باشد که به دلیل بروز بیماری مراجعه کرده‌اند در چنین افرادی تعداد باکتری‌های مفید روده از جمله *بیفیدوباکتریوم*ها بسیار کاهش یافته و یا به حدی می‌رسد که یافتن آن در بین فلورمیکروبی روده امر بسیار مشکلی است (راسیک و همکاران، ۱۹۸۳؛ اسگرباتی و همکاران، ۱۹۹۵). لذا درصد افرادی که *بیفیدوباکتریوم*ها در مدفوع آنها یافت شده است کمتر از گزارش‌هایی است که صرفاً حاصل نتیجه تحقیق برروی افراد سالم بوده است (هارتمینک و همکاران، ۱۹۹۹). علاوه‌بر این به دلیل حساسیت *بیفیدوباکتریوم*ها به هوا، نمونه‌هایی که برای جداسازی *بیفیدوباکتریوم*ها گرفته می‌شوند باید در معرض هوا قرار نگیرند (بیرنز و همکاران، ۲۰۰۰؛ هارتمینک و همکاران، ۱۹۹۹) اما در این تحقیق، برخی از پلیت‌های اولیه کشت شده در حین انتقال از آزمایشگاه تشخیص طبی به آزمایشگاه محل تحقیق در معرض هوا بوده‌اند. ضمناً چون در این آزمایش هدف شمارش *بیفیدوباکتریوم*ها نبوده است و کشت اولیه برروی پلیت و به‌صورت خطی انجام شد ممکن است تعدادی از پرگنه‌ها از دست رفته باشند. به هر حال دلایل مذکور از جمله مواردی است که باید در تحقیقات بعدی مورد توجه قرار گیرند.

خصوصیات بیوشیمیایی: برای شناسایی بیفیدو باکتریوم‌ها در سطح جنس، از آزمایش‌هایی استفاده شد که به‌عنوان بهترین کلیدهای شناسایی برای تفکیک بیفیدوباکتریوم از گروه‌های مشابه استفاده شده است (جدول۲) (میتسوکا، ۱۹۷۷؛ میتسوکا، ۱۹۸٤).

در این تحقیق هزاران کلنی از روی محیط‌های کشت برداشت و مورد بررسی قرار گرفت. تعداد باکتری‌های جدا شده مشکوک به *بیفیدوباکتریوم*ها در آزمایش‌های مرفولوژیک ۱۲٤ ایزوله بوده است که پس از انجام آزمون‌های شناسایی در سطح جنس، تعداد ٦۰ باکتری به‌عنوان *بیفیدوباکتریوم* شناسایی و تست‌های بعدی نظیر تست قندها و آنزیم F٦PPK برروی آنها انجام شد. مطالعات فیزیولوژیک *بیفیدوباکتریوم* ها نشان داده است که متابولیسم گلوکز در *بیفیدوباکتریوم* منحصر به فرد بوده و اساساً به‌عنوان کلید قابل اعتمادی برای شناسایی این باکتری‌ها محسوب می‌شود. بیفیدوباکتریوم‌ها گلوکز را در مسیری تخمیر می‌کنند که در آن فروکتوز ٦- فسفات فسفوکتولاز (F٦PPK) فروکتوز ٦- فسفات را به‌نحوی می‌شکنند که نتیجه نهایی آن تولید اسید استیک و لاکتیک با نسبت تئوریک ۳ به ۲ است (ری، ۲۰۰۱؛ گف و

www.SID.ir

Archive of SID

همکاران، ۱۹۹۶؛ بنو و همکاران، ۱۹۹۲). در این تحقیق نیز به‌عنوان آخرین آزمون تأییدی از تست آنزیم F٦PPK استفاده شد که در این مرحله با حذف ۱۰ ایزوله دیگر تعداد باکتری‌هایی تأیید شده به ۵۰ ایزوله رسید. پس از بررسی باکتری‌های مشکوک با استفاده از آزمایش‌های سطح جنس همه باکتری‌های که خصوصیاتی مشابه *بیفیدوباکتریوم*ها داشتند (در همه آزمایش‌های شناسایی در سطح جنس، جدول ۲، نتیجه منفی بود) و از نظر آنزیمی هم تأیید شدند ضمن نگهداری در محیط نیمه جامد TPY غنی شده با L-سیستئین (۰/۵ g/l) در شرایط بی‌هوازی و در یخچال، برای انجام آزمایش‌های روزانه از آنها کشت‌های لیوفیلیزه نیز تهیه گردید.

پس از تأیید باکتری‌های جدا شده به‌عنوان بیفیدوباکتریوم در سطح جنس، برای شناسایی آنها در سطح گونه الگوی تخمیر قند آنها مورد بررسی قرار گرفت. اختلاف گونه‌های مختلف *بیفیدوباکتریوم* عمدتاً براساس تخمیر کربوهیدرات‌ها است (میتسوکا، ۱۹۹۲). نتایج مربوط به تست قند باکتری‌های جدا شده در این آزمایش در جدول ۳ آورده شده است. کلیه آزمایش‌ها با دو تکرار انجام گرفته است. قندها براساس اینکه به‌عنوان کلیدی برای شناسایی *بیفیدوباکتریوم*ها در مطالعات قبلی استفاده شده بودند انتخاب گردیدند (میتسوکا، ۱۹۷۷؛ میتسوکا، ۱۹۸٤، اسکاردوی، ۱۹۸٦).

گونه‌های اصلی بیفیدوباکتریوم، در انسان عبارتند از: بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس[1]، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم[2]، بیفیدوباکتریوم لانگوم[3]، بیفیدوباکتریوم اینفنتیس[4] و بیفیدوباکتریوم بروی[5] در کولن، تقریباً به‌طور عمومی پذیرفته شده که حضور این بیفیدوباکتریوم‌ها در روده انسان به‌عنوان یک فاکتور سلامتی در نظر گرفته شود (میتسوکا، ۱۹۹٦). دو گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم[6] و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم گونه‌های اصلی بیفیدوباکتریوم جدا شده در این تحقیق را تشکیل می‌دهند. یک ایزوله از بیفیدوباکتریوم کتنولاتوم نیز جدا شده است. ٥٦ درصد از این ایزوله‌ها مربوط به بیفیدوباکتریوم لانگوم و ٢٦ درصد آنها مربوط به *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* است. یکی از دلایل غالب بودن *بیفیدوباکتریوم لانگوم* در نمونه‌ها را توان تحمل بالای این باکتری در حین عبور از روده می‌دانند (اپاژالتی و همکاران، ۲۰۰۳). در حالیکه *بیفیدوباکتریوم ادولسنتیس* این گونه نیست و در صورتی که برای شناسایی و جداسازی آنها از روش‌های کشت برروی پلیت استفاده شود نسبت به *بیفیدوباکتریوم لانگوم* از شمارش کمتری برخوردار است. گرچه وقتی که اپاژالتی و همکارانش از محیط بیرنز استفاده کردند توانستند درصدی از *بیفیدوباکتریوم ادولسنتیس* را جدا کنند اما وقتی از *بیفیدوباکتریوم* مدیوم (BFM) استفاده نمودند قادر به جداسازی *بیفیدوباکتریوم ادولسنتیس* نشدند (اپاژالتی و همکاران، ۲۰۰۳). در این تحقیق نیز این گونه از بیفیدوباکتریوم جدا نشده است.

بیفیدوباکتریوم اینفنتیس و بیفیدوباکتریوم بروی معمولاً در روده نوزادان یافت می‌شوند که با رسیدن به بزرگسالی به وسیله بیفیدوباکتریوم لانگوم یا بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس جایگزین می‌شوند (میتسوکا، ۱۹۹٦). دلیل آن را تغییر در رژیم غذایی و نوع عوامل تقویت‌کننده رشد بیفیدوباکتریوم‌ها می‌دانند که همراه غذا جذب می‌شوند (میتسوکا، ۱۹۹۰). با توجه به اینکه در این تحقیق تنها یک ایزوله مربوط به شیرخوران بوده لذا شانس یافتن این گونه‌ها نیز کمتر بوده است. از بین ۳۲ ایزوله بیفیدوباکتریوم لانگوم ١٦ ایزوله دقیقاً از نظر الگوی تخمیر قند مشابه این گونه و ١٦ تای دیگر تنها در تخمیر ریبوز با بیفیدوباکتریوم لانگوم اختلاف دارند. الگوی تخمیر ۷ ایزوله با هیچ یک از بیفیدوباکتریوم‌هایی که تا کنون شناخته شده است دقیقاً یکسان نیست. این گروه از بیفیدوباکتریوم‌های جدا شده را می‌توان نژادهای جدیدی از بیفیدوباکتریوم‌ها دانست، اثبات موضوع به بررسی‌های بیشتری از جمله بررسی ژنتیکی نیاز دارد که در حال مطالعه است و نتایج آن در مقالات بعدی خواهد آمد.

1- Bifidobacterium adolescentis
2- B. bifidum
3- B. longum
4- B. infantis
5- B. breve
6- B. catenulatum

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- گروه‌های سنی مورد آزمون، تعداد و وضعیت نمونه‌های گرفته شده از آنها.

گروه	تعداد نمونه	تعداد نمونه‌های مثبت (درصد)	تعداد نمونه‌های منفی (درصد)	تعداد افراد بیمار درگروه	ملاحظات
اول	۵	۴ (۸۰)	۱ (۲۰)	۲ (۴۰)	تعداد نمونه‌ها کم است
دوم	۵۰	۳۷ (۷۴)	۱۳ (۲۶)	۱۰ (۲۰)	---
سوم	۲۸	۱۶ (۵۷)	۱۲ (۴۳)	۷ (۲۵)	---
چهارم	۲	۰ (۰)	۲ (۱۰۰)	---	تعداد نمونه‌ها خیلی کم است

جدول ۲- ویژگی‌های کلیدی در تشخیص *بیفیدوباکتریوم*ها از جنس‌های مشابه[a]

خصوصیات	*بیفیدوباکتریوم*	*آکتینومایست*	*پروپیونی باکتریوم*	*یوباکتریوم*	*لاکتوباسیلوس*
فرآورده اصلی تخمیر [b]	AL	S	P	B,AF, none	L
رشد در شرایط هوازی	-	+	V	-	V
تولید گاز از گلوکز	-	-	-	V	V
تولید کاتالاز	-	V	+-	-	-
تولید نیترات	-	+-	+-	V	-
تولید ایندول	-	-	V	-	-
تجزیه ژلاتین	-	-+	+-	V	-
تولید اسید از:					
رامنوز	-	V	+-	-+	V
سوربوز	-	V	V	-+	-+
گلیسرول	-	-	+-	-+	-+
اریتریتول	-	-	+-	-+	-+
آدونیتول	-	-	V	-+	-+
دولسیتول	-	-	-+	-+	-+

[a] علائم: + = مثبت ؛ - = منفی ؛ V = متغیر ؛ +- = اکثراً مثبت ؛ - + = اکثراً منفی

[b] A= اسید استیک ؛ B= بوتریک اسید ؛ F= فوماریک اسید ؛ L = لاکتیک اسید ؛ P = پروپیونیک اسید؛ S = سوکسینیک اسید

مأخذ: اسکاردوی (۱۹۸۶).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- نتایج تخمیر قندهای مهم مربوط به بیفیدوباکتریوم های جداشده [a]

کربوهیدرات‌ها / سویه‌های مورد آزمایش	آرابینوز	سلوبیوز	اسکولین	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکز	لاکتوز	مالتوز	مانیتول	مانوز	ملیبیوز	ملیزیتوز	رافینوز	رئیوز	سالیسین	سوربیتول	نشاسته	ساکارز	ترهالوز	زایلوز	گونه شناسایی شده
F۱۰۱۱،M۰۵۲۱ M۲۰۱۱،M۲۰۱۲ M۱۵۱۲،M۱۵۱۶ M۰۸۱٤،M۱۵۱۷ M۰۸۱٦،F۰٤۱۱ M۲۵۲۱،M۰۸۱۱ ،F٤۳۲۲،F۰۳۱۲ F۰٤۱۲ ،F۰٤۱۳	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	*بیفیدوباکتریوم لانگوم*
M۰۳۱۱،M۱۵۱۱ M۱۵۱۸،M۱۵۱٤ F۰۲۱۱ ،M۰۸۱۵ F۰۳۱٤ ،M۰۸۱۲ F۰٦۳۲ ،M۰۸۱۷ F٤۳۱۱ ،F٤۳۱۲ M۱۵۱۵،M۱۵۱۳ F۰۳۱۳ ،F٤۳۲۱	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	+	*بیفیدوباکتریوم لانگوم*
F۱۷۱۱ ،F۰۵۱۱ F۰۵۲۱ ،F۰٤۲۱ UU۱۱ ،M۰۳۱۳ M۰۳۲۱ ،F۰۹۱۱ F۰۹۱٤ ،F۰۹۱۳ F۰۹۱۲	-	-	-	+	+	+	+	V	-	-	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	*بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*
F۰٦۲۱	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	*بیفیدوباکتریوم کتنولاکتوم*
F۱۷۱۲	+	V	V	+	+	+	+	+	-	V	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	گونه‌هایی که الگوی تخمیر متفاوتی از بیفیدوباکتریوم‌های شناخته شده دارند
F۱۷۱۳	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	
M۰۸۱۳	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
F۰۳۱۱	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	w	+	+	+	+	
F۰٦۱۱	+	-	-	+	+	+	+	+	V	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	
F۲۵۱۱	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	V	+	V	+	+	
F۰٦۳۱	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	

[a] علائم: + = مثبت؛ − = منفی؛ V= متفاوت؛ W= ضعیف.

www.SID.ir

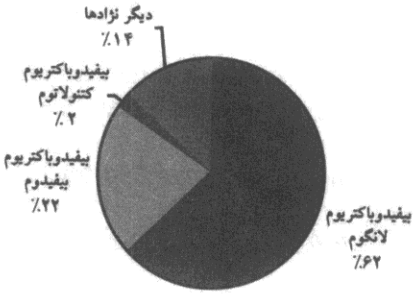
Archive of SID

از آنجا که این تحقیق در نوع خود برای اولین بار در ایران انجام شده و با توجه به نتایج حاصل و جداسازی نژادهای متمایز از نژادهای شناخته شده موجود، لازم است تا بررسی همه جانبه‌ای برای شناسایی *بیفیدوباکتریوم*های نژاد ایرانی انجام شود و در خصوص استفاده از آنها در فراورده‌های غذایی تحقیقات بیشتری صورت گیرد.

با توجه به نتایج حاصل (شکل ۱) بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم دو گونه مهم و شاخصی هستند که بیشترین فراوانی جمعیت بیفیدوباکتریوم‌ها، بترتیب ۶۲ و ۲۲ درصد، را بین افراد مورد آزمایش داشته‌اند. از آنجا که همه افراد مورد آزمایش از سلامتی برخوردار بوده‌اند، حضور این باکتری‌ها به‌عنوان گروه‌های مفید و ایمن مجدداً مورد تأیید قرار می‌گیرد. همانگونه که در ابتدا اشاره شد هدف اصلی تحقیق جمع‌آوری اطلاعاتی در خصوص بیفیدوباکتریوم‌ها در ایران و معرفی گونه‌های برتر جهت رسیدن به نتیجه‌ای قابل ارائه به صنایع لبنی برای انتخاب استارتری مناسب در فراورده‌های پروبایوتیک بوده است. برخی از محققان بر این باورند که برای بهره‌مند شدن از مزایای حضور بیفیدوباکتریوم‌ها بهتر است گونه‌هایی به همراه فراورده‌های لبنی مصرف شوند که در روده فرد مصرف‌کننده غالب هستند (گومز و همکاران، ۱۹۹۹) با چنین فرضی و با تکیه بر یافته‌های این پژوهش می‌توان پیشنهاد نمود که استارترهای حاوی بیفیدولاکتریوم لانگوم و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم بهترین انتخاب برای استفاده در فراوردهای حاوی یفیدوباکتریوم‌ها در ایران است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله بر خود لازم می‌دانم از زحمات بی‌دریغ و بزرگوارانه همه عزیزانی که در اجرای این پروژه مرا یاری دادند کمال تشکر و قدردانی را نمایم. بخصوص جناب آقای مهندس علی‌گل موحد بدلیل همکاری تمام وقت و صمیمانه‌شان در آزمایشگاه، آقای دکتر مسعود شاهرودیان و همکارانش در آزمایشگاه تشخیص طبی پاسارگاد مشهد، آقای دکتر سنکیان و همکارانش در پژوهشکده بوعلی مشهد، آقای مهندس قزوینی، خانم سهیلا مشکوری، خانم آجری و همه افرادی که در انجام آزمایش‌های، تهیه مواد، تایپ و بقیه امور مرا یاری دادند.



شکل ۱- توزیع نژادهای جدا شده بیفیدوباکتریوم‌ها در این تحقیق.

منابع

1.Andrews, W. 1992. Manual of food quality control 4. Rev. 1. Microbiological analysis, FAO food and Nutrition, 338pp.

2.Appajalahti, J.H.A., Kettunen, A., Nurminen, P.V., Jatila, H., and Holben, W.E. 2003. Selective plating underestimates abundance, and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. Applied and Environmental Microbiology, 69, 5731-5735

3.Arunachalam, KD. 1999. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. Nutrition Research, 19 (10): 1559-1597.

www.SID.ir

Archive of SID

4.Baron, EJ., and Fine gold, SM. 1994. Bailey and Scott's diagnostic microbiology, 9th edition, The CV. Mosby Company, St Louis, 958pp.
5.Baron, M., Roy, D., and Juilliard, J.C. 2001. Biochemical characteristics of fermented milk produced by mixed-cultures of lactic starters and bifidobacteria. Lait. 2000, 80: 5, 465-478.
6.Beerens, H., Gavini, F., and Neut, G. 2000. Effect of exposure to air on 84 strains of biodobacteria. Anaerobe, 6: 65 – 67.
7.Beerens, H. 1990. An elective, and selective isolation medium for bifidobacterium spp. Letters in Applied Microbiology, 11: 155-157.
8.Benno, Y., and Mitsuoka, T. 1992. Impact of *Bifidobacterium langum* on human. Microbial. Immonol. 36, 683-694.
9.Chevalier, P., Roy, D., and Ward, P. 1990. Detection of Bifldobacterium species by enzymatic methods. Journal of Applied Bacteriology, 68: 619-624.
10.Daivid, M., and Gibson, G.R. 1999. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. Am. J. Clin. Nutr. 69(suppl): 1052S-7S.
11.Fooks L.J., and Fuller, R. 1999. Prebiotics, probiotics, and human gut microbiology. Int. Dairy J., 9: 53-61.
12.Frédéric k. 1997. Bifidobacterium species, PhD Thesis, Université des Science et Techniques de Lille (France), No. 1940.
13.Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A., and Mitsuoka, T. 1998. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin a production in healthy children. International Journal of Food Microbiology 42:39-44.
14.Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1401–1412.
15.Gibson, G. R., and Wang, X. 1994. Inhibitory effects of Bifidobacteria on other colonic bacteria. J. Appl. Bacteriol. 77: 412– 420.
16.Gob betti, M., Corsetti, A. Smacchi, E, Zocchetti, A., and De-Angelis, M. 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. Journal of dairy science, 81(1) 37-47.
17.Goff, HD., and Modler, H.W. 1996. Bifidobacteria, fructooligosaccharides and ice cream. Canadian-Dairy. 75: 3, 10.
18.Gomes, AMP., and Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, Trends in Food Science, Technology, 10: 139-157.
19.Hartemink, R., and Rombouts, F.M. 1999. Comparison of medium for the detection of Bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal sample. Journal of Microbiological Methods, 36:181-192.
20.Klaver, FA., and van der Meer, R. 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-deconjugating activity. Appl. Environ. Microbial. 59 (4):1120-1124.
21.Lambert, J., and Hull, R. 1996. Upper gastrointestinal tract disease and probiotics. Asia Pacific Journal of Clinical. 5 (1): 31-35.
22.Mitsuoka,T. 1977. Ecology of *Bifidobacteria*. The Amrican Journal of Clinical Nutrition. 30:1799-1810.
23.Mitsuoka, T. 1984. Taxonomy and ecology of *Bifidobacteria*. Bifidobacteria Microflora. 3(1): 11-28.
24.Mitsouka, T. 1990. Beneficial microbial aspects (Probiotics). 23 rd Mt. Dairy Congr. Vol.2: 1226-1236.
25.Mitsuoka T. 1992. The human gastrointestinal tract. In: Wood BJB. (Eds): The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier, London: 69-114.
26.Mitsuoka, T. 1996. Intestinal flora and human health. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 5 (1): 2-9.
27.O'Sullivan, D.J., and Cullen, M.J. 1998. Tracking of probiotic *Bifidobacteria* in the intestine. Int. Dairy Journal, 8: 513-525.
28.Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavanen, P.V., and Salminen, S.J. 1999. Adhesion of four bifidobacterium strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. FEMS Microbiology Letters, 172: 61-64

www.SID.ir

Archive of SID

29.Pereira, D.I.A., and Gibson, G.R. 2002. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria Iiolated from the human aut. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4689-4693.

30.Rasic, J.L., and Kurmann., J.A. 1983. Bifidobacteria and their role. Microbiological, nutritional, physiological, medical and technological aspects and bibliography. Experientia-Supplementum.295pp., Yugoslavia.

31.Rasic, J.L.j, and Sad, N. 1990. Culture media for detection and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products. Bulletin of IDF, No.252: 24-34 11.

32.Rasic, J.L, Vujicic, I.F., Skrinjar, M., and Vulic, M. 1992. Assimilation of cholesterol by some cultures of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Biotechnol. Lett. 14:39-44.

33.Rokiah, M.Y., Formuzul, h., Maznah, I., and Zaiton, H. 2000. Isolation of Bifidobacteria infantis and its antagonistic activity against ETEC 0157 and *Salmonella typhimurium* S-285 in weaning foods. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 9 (2): 130-135

34.Roy, D. 2001. Media for the isolation and enumeration of Bifidobacteria in dairy products (Review). International Journal of Food Microbiology, 69: 167-182.

35.Roy, D., Ward, P. 1990. Evaluation of rapid methods for differentiation of Bifidobacterium species. Journal of Applied Bacteriology, 69:739-749

36.Scardovi, V. 1986. Genus Bifidobacterium. In: Sneath, P. et al (eds.) Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.2. Williams and Wilkins, Baltimore: 1418-1433.

37.Sgorbati B., Biavati, B., and Palenzona, D. 1995. The genus bifidobacterium. P. 279-306, In: Wood BJB, Holzapfel WH (eds.): The Lactic Acid Bacteria. Vol.II. Chapman and Hall, New York.

38.Silvi, S., Rumeny, C.J., and Rowland, I.R. 1996. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. J.Appl. Bacteriol., 81, 561-564

39.Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. and Reddy, B.S. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis, 18: 4, 833-841.

40.Snedecor, G.W., and Cochran, W.G. 1989. Statistical methods. Iowa State Univ., Ames, Iowa, USA, 503pp.

41.Tomoda, T., Nakano, Y., and Kageyama, T. 1991. Effect of yogurt supplemented with Bifidobacterium and/or lactulose in healthy persons, a comparative study. Bifidobacteria Microflora, 10, 123-130.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 12(3), Aug - Sep 2005
www.magiran.com/jasnr

Isolation, identification and distribution of *Bifidobacterium* spp. in some Iranian subjects

M. Khomeiri[1], H.B. Ghoddusi[2], A. Mortazavi[2], A. Khamessan[3], D. Ahmad[4] and F. Shahidi[2]

[1]Former post- graduate Student of Ferdowsi University of Mashhad and Faculty member of University of Agricuitueral Science and Natural Resources of Gorgan, [2]Faculty member of Ferdowsi Univerersity of Mashhad, [3]Director of Biotechnology Division Actilab Pharma Inc, Montral, Canada, [4]Faculty member of Institut National de le recherché Scientifigue INRs, Montral, Canada.

Abstract

The aim of the present work was to isolate and to determine the distribution of *Bifidobacterium* spp. in Iranian subjects. Fecal samples were collected from 90 subjects in four age groups. *Bifid obacterium* spp. was isolated from 70% of fecal samples. 50 strains of *Bifidobacterium* were isolated and characterized on the basis of morphological, biochemical and enzymatic tests. 62, 22, and 2% of the isolated strains were Blowgun, *B.bifidum* and *B.catenulatum*, respectively. 14% of the isolated strains were not resemblance with the strains which identified by now. This study showed that *B. longum* and *B.bifidum* are the commonest Bifidobacterium in the Iranian subjects. Therefore, can be suggested as proper strains to be used in bifidus probiotic products in Iran.

Keywords: *Bifidobacterium;* Probiotic; Iranian strains; Isolation and Identification; Iran

www.SID.ir