Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Isolation of Probiotic Lactobacilli Bacteria from Traditional Naein Dairy Product (Koome)

Nina Shemshad [1], Leila Roozbeh Nasiraie [2,3*], Reza Majidzadeh Heravi [4]

1. *PhD Student, Department of Science and Food Technology,Nour branch, Islamic Azad University, Nour, Iran*
2. *Assistant Professor, Department of Science and Food Technology,Nour branch, Islamic Azad University , Nour, Iran*
3. *Manager of Research and development center, Shams Bavaran Salamat Nour Consulting & Production Services, Tehran, Iran*
4. *Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran*

10.30699/ijmm.15.1.85

ABSTRACT

Background and Aim: Koome as one of the traditional fermented dairy products of ovine milk has long been produced in rural areas around Naein, Iran in sheepskin bags. The present study aimed to isolate Lactobacillus bacteria from the traditional dairy products of Naein and to evaluate the functional characteristics and health of these bacteria as probiotics.

Materials and Methods: For the initial isolation of bacteria, de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar was used. A total of 15 bacilliform, gram-positive, and catalase-negative colonies were isolated from the culture, and resistance to acid, bile, gastric juice, and intestinal juice was assessed to investigate probiotic characteristics. Bacterial isolates with favorable probiotic characteristics were tested for antimicrobial activity and antibiotic resistance to assess the effect of probiotics on health. Afterwards, seven bacterial isolates were selected and their ability for reducing cholesterol and hydrolyzing bile salts was evaluated. Moreover, the selected isolates were sequenced to identify the strain.

Results: Our findings demonstrated that six of 15 bacterial isolates had a suitable resistance in pH=2.5. In addition, 60% of the isolates were sensitive to bile salts. The identified Lactobacillus isolates had a high antibiotic resistance and were shown to have a favorable antimicrobial activity against pathogenic bacteria. Furthermore, the selected bacterial isolate could reduce 70% of environmental cholesterol.

Conclusion: According to the results of the present study, koome is highly potential for isolating probiotic isolates and the nutritional consumption of Lactobacillus isolates s microbial supplement might have positive effects on health.

Keywords: Diary products, Koome, Lactobacillus, Probiotic

Received: 2020/05/15; **Accepted**: 2020/11/07; **Published Online:** 2021/01/10

Corresponding Information: **Leila Roozbeh Nasiraie** Assistant Professor, Department of Science and Food Technology, Islamic Azad University- Nour branch, Nour, Iran. Email: leila_roozbeh@yahoo.com

Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online

Shemshad N, Roozbeh Nasiraie L, Majidzadeh Heravi R. Isolation of Probiotic Lactobacilli Bacteria from Traditional Naein Dairy Product (Koome). Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (1) :85-106

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks

Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

Introduction

Fermented products, such as yogurt, kefir, sauerkraut, kombucha, and other dairy products, which have traditionally been used by people since ancient times now entered the field of biotechnology (1). Science of probiotic therapy as the result of the development of this process in food microbiology addresses the beneficial influences of probiotics (live microorganisms in food) in the host body (2).

Therapeutic effects and the positive impacts of probiotics on health are important due to stimulating the growth of intestinal beneficial microorganisms, decreasing the population of harmful bacteria, and helping the natural defense mechanisms of the body **(3)**. Benefits of the lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditional dairy products in preventing and treating diseases have been confirmed and no negative side effects have been noted for these probiotics **(4)**.

Probiotic bacteria of the LAB group are gram-positive bacteria present in the microbial flora of the human digestive system. These bacteria are applied in food fermentation procedures and nowadays are considered as a mucosal barrier with the ability for regulating immune responses **(5)**. According to the National Food Standard, probiotic bacteria should survive not only during the shelf life of food but also after passing through gastric acid, enzymes, and bile alkaline salts and should reach their activity site (intestine). Therefore, the foods which are claimed to impose healthy effects need to contain 10^7 living probiotics per one gram at the time of consumption **(1)**.

Lactobacilli were isolated from milk the first time and nowadays in the food industry, probiotics are known as a part of fermented dairy products, including kefir and soured milk. Over 70 products containing LAB are being produced throughout the world, namely sour cream, powdered milk, and fermented beverages **(1)**. Koome is a traditional dairy product of ovine milk, which has long been produced in sheepskin bags in the rural areas around Naein, Isfahan province, Iran. Considering the unique physicochemical and microbiologic characteristics and the lack of salt, koome could be proposed as one of the best traditional dairy products with long shelf life.

Sharifi *et al.* (2017) evaluated 96 samples of traditional bovine, ovine, and caprine yogurt. Their results revealed that 47 samples had LAB with probiotic characteristics, including Lactobacillus lactis, L. brevis, and *L. fermentum* **(6)**. Famouri *et al.* (2017) investigated the therapeutic characteristics and health effects of *L. plantarum* and L. brevis isolated from ten specimens of traditional fermented dairy products. Reduced serum cholesterol and heavy metals were among the favorable findings **(7)**.

Handa *et al.* (2016) studied the LAB from two samples of fermented grain-based drinks. They isolated and identified the LAB with probiotic characteristics, such as *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus acidophilus* and confirmed the positive effects of these bacteria on health **(2)**. The present study aimed to isolate Lactobacilli with probiotic potential from the traditional dairy products of Naein, Iran. This genus of bacteria is widely used in diverse industries, namely the food, pharmaceutical, and supplements industries. Therefore, the recognition and classification of this genius of bacteria provide valuable information for researchers in different fields.

Materials and Methods

Sampling and Microbial Culture

A total of five bovine koome samples and three ovine koome specimens were collected from the surrounding rural areas of Naein. Next, for isolation, a homogeny of 10 g of each sample in 90 mL of diluent was made and serial dilutions were obtained. The dilutions were inoculated on MRS agar and were incubated at 37°C for 24 h. The grown colonies were tested for isolating Lactobacilli from other organisms and morphologic evaluation. To this aim, each colony was cultured on medium to reach a single colony and purify. Afterwards, the purified culture was stored for further tests **(8)**.

Isolating Lactobacilli

A catalase test was carried out to check the production of catalase enzyme by bacteria. In this test, a small part of the intended colony was placed on a sterile slide using a sterile loop and was mixed with a drop of hydrogen peroxide 3% (catalase reagent). The lack of bubble production means that the tested bacterium does not produce catalase enzyme and is known as catalase-negative. At the end of this step, the bacilliform, catalase-negative, and gram positive Lactobacilli colonies with different morphologies were coded and assessed for probiotic properties. Superficial culture was performed from the coded samples **(9)**.

Probiotic Evaluation

Resistance to Bile and Acid Conditions

Survival of microorganisms was investigated in broth medium with acidic pH of 2, 2.5, and 3 similar to the digestive system. The number of living microorganisms was counted as presented as a percentage of the initial number following incubation at 37°C for 1 and 2 h. Resistance and growth reduction of microorganisms were assessed through incubating at 37°C for 8 h the presence of 0.7% and 1% of bile salts (bile oxalate).

The resistance of microorganisms in gastric and intestinal conditions was tested by inoculation to simulated broth media for the stomach (6.23 g sodium chloride, 0.229g calcium chloride, 2.29 g potassium chloride, 1.2 g sodium bicarbonate, pepsin enzyme with the concentration of 0.3%, and pH=2±0.2) and intestine (1.28 g sodium chloride, 0.239 g potassium chloride, 6.4 g calcium bicarbonate, 0.5% X-gal and

pancreatin enzyme with the final concentration of 0.1%, and pH=8). Next, culture was completed on agar medium and colonies were counted following overnight incubation at 37°C **(8)**.

Identification of Acid-producing Bacteria

Acidproductionin culture medium by microorganisms was investigated based on pH reduction in the medium after 24 h incubation at 37°C. Bacteria with a lower pH than the initial pH of 6.22 were considered as acid-producing microorganisms **(10)**.

Antimicrobial Activity

The ability of the intended isolates for producing antimicrobial compounds against standard pathogen bacteria was examined based on the presence of the zone of inhibition on agar medium. In this method, 200 µL of the active culture of pathogen bacterium was inoculated to a tube containing nutrient agar culture medium 1% (soft agar) and was added to nutrient agar 1.5% in a plate after cooling and was refrigerated for 30 min. Afterwards, sterile blank discs dipped in the supernatant of the isolate were fixed smoothly on the plate and were refrigerated for 20 min followed by incubation at 37°C. After incubation, the zone of inhibition was measured using a ruler and the presence of this zone was reported as antimicrobial impact against pathogen microorganisms **(11)**.

Antibiotic Resistance

Sensitivity or resistance of probiotic bacteria to common antibiotics in medicine was evaluated by measuring the diameter of the zone of inhibition. First, active culture was prepared from probiotic bacteria. Next, 4 mL of sterile MRS agar 1% was poured into each tube. Following the cooling of culture media, 200 µL of fresh active probiotic culture was inoculated to each tube and was mixed thoroughly.

Plates containing MRS agar 1.5% were prepared and located at room temperature for 10 min to reach room temperature. Afterwards, a culture medium containing the prepared bacterium was gently added to the plate and refrigerated for 30 min until the bacteria were absorbed on the medium. Plates were taken out of the refrigerator and sterile antibiotic discs with a diameter of 0.7 cm were located and the plates were refrigerated for 20 min. Next, plates were incubated at 30°C for 12 h and the diameter of the zone of inhibition was measured on 8-12 h and the final diameter was presented in mm. Test results were reported as resistant, semi-sensitive, and sensitive according to the size of the zones of inhibition **(12)**.

Cholesterol Reduction Test

In order to evaluate the ability of microorganisms for cholesterol hydrolysis, 0.2 mL of microorganism suspension in broth medium was inoculated to 20 mL of culture medium containing 100 µg/mL of cholesterol oxalate and was incubated at 37°C for 16 h. Afterwards, the tubes were centrifuged at 8000 rpm for 5 min at room temperature. Next, o.5 mL of the supernatant was transferred to a glass tube and was mixed with 3 mL ethanol 95% followed by adding 2 mL potassium hydroxide 50%. The mixture was homogenized by 1 min vortex after the addition of each component.

The tubes were heated in a water bath of 60°C for 10 min and were cooled at room temperature. In the next step, 5 mL hexane was added to each tube and vortex was used for 20 sec followed by adding 3 mL of distilled water and 1 min vortex. The tubes were left at room temperature for 15 min or until the water and organic phases were completely separated. Afterwards, 2.5 mL of hexane layer (the upper layer) was poured into clean tubes and hexane was evaporated at 65°C in a water bath.

The liquid remaining in the tubes was mixed with 4 mL of o-phthalaldehyde and was kept at room temperature for 10 min. Next, 2 mL of sulfuric acid was added to each tube and was left at room temperature for 10 min. the absorbance of samples was read using a spectrophotometer at the wavelength of 550 nm versus blank **(13)**.

Bile Salt Hydrolase Activity Assay

The zone of deoxycholic acid precipitation around the colonies in the culture medium containing the salt of bile acids was evaluated. To this aim, 10 µL of microorganism suspension was cultured on the surface of the MRX agar plate and was incubated at a suitable temperature. In the case of hydrolase activity, white precipitation and scattered zones surrounding colonies were clear. When these zones could not be observed, 0.037% calcium chloride could be added to the culture and blank discs dipped in 10 µL bacterial suspension are applied on the plate surface. A zone of white precipitation around the disc indicates bile salt hydrolysis by the tested bacterium **(14)**.

Identification of the Isolates Selected by Probiotic Tests

Seven isolates with relative priority to other isolates in probiotic tests were identified by the DNA sequencing of the 16s ribosomal region. The mentioned region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) utilizing Gradient Palm-Cycler (Corbett Life Science Pty. Ltd., Australia). General primers with the forward sequence of 5'GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3' and the reverse sequence of 5'GAA AGG AGG TGA TCC AGC CG 3' were applied for amplifying the intended segment **(15)**.

The reaction set was as follow: 2 min at 95°C, 35 cycles at 95°C for 45 sec, 45 sec at 53°C, 60 sec at 72°C

and the final step of 3 min at 73°C. The reaction product was electrophoresed on 0.8% agarose gel, the segment was extracted from the gel and after confirming the band length and concentration determination, it was sent to Microsynth, Switzerland for sequencing.

Statistical Analysis

The obtained data were analyzed as a random design with 3 repeats using SAS version 9.2. Moreover, Excel software version 2010 was used to draw the graphs.

Results

Resistance to Bile Salts and Acid

Findings of catalase test, gram staining, and the microscopic examination of isolates revealed that 15 colonies were bacilliform, gram positive, and catalase-negative, which were selected for probiotic tests and were encoded as S1-S15. The results of bile salts resistance assay at the concentrations of 0.3%, 0.7%, and 1% following 8 h of incubation are demonstrated in Table 1.

Moreover, the findings of testing X-gal 0.3% for the 15 intended isolates showed that S5 was highly resistant and S8, S9, S11, and S14 were resistant. In addition, S1, S2, S3, S4, S6, S7, S10, S13, and S15 isolates were sensitive. In media containing 0.7% and 1% bile salts. The isolates S8, S5, and S11 were resistant, while S9 and S14 were found as sensitive. As a result, 20% of the isolates were resistant to 0.7% and 1% concentrations of bile salts and S8, S5, and S11 were known as bile-resistant isolates.

Test of resistance to acid revealed that S15, S14, S13, S10, S2, and S1 were not sufficiently resistant to pH=3 following an hour of incubation at 37°C and had the viability percentage of zero. On the other hand, S11 and S12 had the highest viability rate of 96% followed by the isolates S9, S8, S7, S6, S5, S4, and S3 with the viability of 55%-60% after an hour of incubation. The resistant isolates in the latter step were tested at pH=2.5. The lowest and highest viability percentages following two hours of incubation at pH=2.5 were observed for S12 and S9, respectively. Afterwards, the resistant isolates in this stage were tested at pH=2. The results indicated that the most resistant bacteria to acid pH were S11, S7, and S5.

Table 1. Inhibition coefficient of samples in the assay of resistance to 0.3%, 0.7%, and 1% bile salts after 8 h incubation at 37

Bacterium code	Inhibition coefficient 0.3%	Final result	Inhibition coefficient 0.7%	Final result	Inhibition coefficient 1%	Final result
S1	1	Sensitive	-	-	-	-
S2	0.91	Sensitive	-	-	-	-
S3	1	Sensitive	-	-	-	-
S4	1	Sensitive	-	-	-	-
S5	0.19	Highly resistant	0.39	Resistant	0.14	Resistant
S6	1	Sensitive	-	-	-	-
S7	0.84	Sensitive	-	-	-	-
S8	0.31	Resistant	0.29	Resistant	0.28	Resistant
S9	0.37	Resistant	0.98	Sensitive	0.74	Sensitive
S10	1	Sensitive	-	-	-	-
S11	0.43	Resistant	0.24	Resistant	0.43	Resistant
S12	0.85	Sensitive	-	-	-	-
S13	0.53	Sensitive	-	-	-	-
S14	0.24	Resistant	0.62	Sensitive	1	Sensitive
S15	1	Sensitive	-	-	-	-

Resistance to gastric juice was evaluated in 0, 30, 60, 90, and 120 min (Figure 1A). In this assay, isolates S5, S7, and S11 were tested as the isolates selected by acid test and S5, S8, and S11 as the isolates chosen by the bile resistance test. However, S14 was examined due to resistance to 0.3% bile and isolates S3, S4, S6, S9, and S12 were assessed because of resistance to pH=3.

The results are summarized in Figure 1. As could be observed, isolates S4, S14, and S6 had the lowest resistance to the simulated conditions of the stomach as viability reached zero after 30 min. isolates S8, S9, and S12, which were resistant to pH=2.5 but sensitive to pH=2, were destroyed after 120 min of exposure to simulated gastric conditions. The isolates resistant to pH=2, including S7, S11, and S5 were the most resistant bacteria to gastric simulated conditions following 2h of incubation. However, S7 and S11 have significantly higher viability than S5 (P<0.05) as they showed the viability of 62%, 59%, and 40%, respectively.

Resistance to intestinal juice was assessed on 0, 30, 60, 90, and 120 min (Figure 1B). As demonstrated, the S6 isolate had the lowest resistance to the simulated conditions of the intestine as the viability reached zero in 30 min. The viability of isolates S3 and S9 was zero following 60 min. in the present study, S3 and S9 were reported to be sensitive to the bile concentration of 0.3% and 0%, respectively. Viability of S4, S7, S12, and S14 reached zero in 90 min, all of which were sensitive to 0.3% bile except S14, which was found to be sensitive to 0.7% bile.

Finally, S5 and S11 isolates were able to tolerate intestinal simulated conditions with a 50% decrease in viability in 120 min. however, the mentioned isolates were not significantly different in terms of viability (P>0.05). Viability of S8 was zero after 120 min showing the lower resistance of this isolate, compared to S5 and S11.

Table 2 indicates the findings of the medium pH reduction test. Isolates S7 and S10 caused the highest and lowest pH decrease, respectively. Furthermore, isolates S3, S4, and S5 were not significantly different from S7 in this regard (P>0.05).

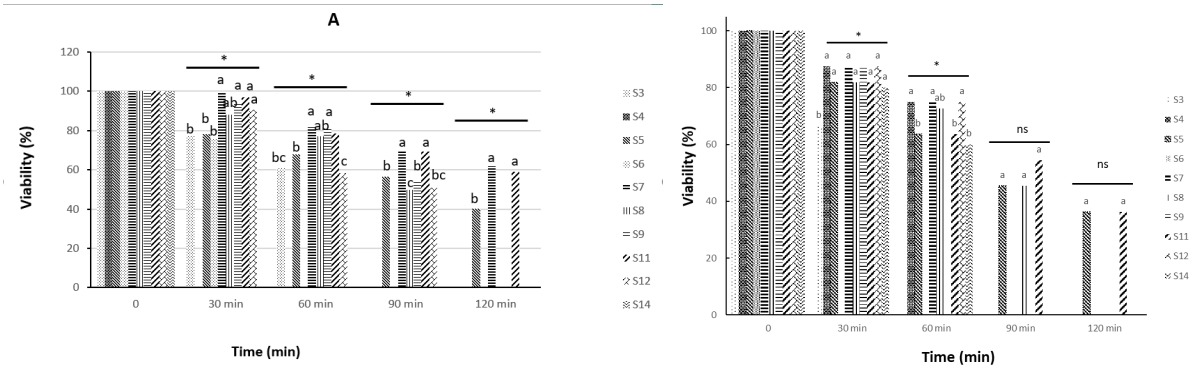


Figure 1. Viability percentage of the samples in the simulated conditions of gastric juice (A) and intestinal juice (B) during 2 h of incubation at 37. Different letters indicate significant difference among various treatments (p< 0.05).

Table 2. Percentage of medium pH reduction by bacterial isolates derived from Naein traditional dairy product after 24 h of incubation at 37

Bacterium code	Final pH	pH reduction percentage	Ranking
S1	5.67	^{de}8.8	13
S2	4.98	19.9^{cd}	11
S3	3.63	41.6^{ab}	3
S4	3.78	39.2^{ab}	5
S5	3.67	40.9^{ab}	4
S6	4.6	26^{bcd}	8
S7	2.67	57^{a}	1
S8	5.83	6.2^{de}	14

Bacterium code	Final pH	pH reduction percentage	Ranking
S9	4.19	32.6^{bc}	7
S10	5.94	4.5^{e}	15
S11	3.39	45.4^{b}	2
S12	5.17	16.8^{d}	12
S13	3.91	37.1^{bc}	6
S14	4.78	23.1^{bcd}	9
S15	4.89	21.3^{bcd}	10
P-value		0.001	
Mean standard error		4.023	

Values with different superscript letters in the column mean the significant difference between treatments (P<0.05)

Antimicrobial Activity

Findings of antimicrobial activity tests are demonstrated in Table 3. The highest antimicrobial effect was observed for S4 and S9 isolates (*P*<0.05). In other words, these isolates are the best choices for inhibiting *Salmonella typhimurium*. The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* was significantly better inhibited by S4, S5, S12, and S14, compared to other isolates (*P*<0.05). Isolates S3, S6, and S8 significantly inhibited Escherichia coli (*P*<0.05). Moreover, Staphylococcus aureus was significantly inhibited by S7 and the yeast *Candida albicans* were inhibited by S3 and S14 (*P*<0.05).

Table 3. Antimicrobial activity and ranking of isolates based on the diameter (mm) of the zone against pathogen bacteria

TBacterium code	*Salmonella typhimurium*		*Escherichia coli*		*Staphylococcus aureus*		*Pseudomonas aeruginosa*		*Candida albicans*	
	Ranking	Zone diameter	Ranking	Zone diameter	Ranking	Zone diameter	Ranking	Zone diameter	Ranking	Zone diameter
S3	8	12^{bc}	2	23.5^{a}	6	17^{ab}	5	19.5^{ab}	2	23^{a}
S4	2	21.5^{a}	10	9^{bc}	4	19^{ab}	4	21.5^{a}	10	7.5^{b}
S5	5	15^{bc}	8	13^{abc}	8	9^{c}	3	22^{a}	6	17.5^{ab}
S6	10	8.5^{cd}	3	21.75^{a}	7	13^{bc}	6	18.75^{ab}	9	8^{b}
S7	6	14.25^{bc}	9	12.25^{abc}	1	22^{a}	8	18^{ab}	4	18.75^{ab}
S8	4	18.5^{ab}	1	25^{a}	10	8^{c}	9	14^{ab}	7	17^{ab}
S9	1	23.5^{a}	6	18^{ab}	3	19.5^{ab}	7	18.5^{ab}	5	18.5^{ab}
S11	9	10^{bc}	11	6.5^{c}	11	7.5^{c}	11	7.5^{c}	8	14^{b}
S12	3	19^{ab}	5	19^{ab}	5	18.5^{ab}	1	25^{a}	11	7^{b}
S14	11	7.25^{cd}	7	17.5^{abc}	9	8.5^{c}	2	22.5^{a}	1	23.5^{a}
Antibiotic	Cefalexin		Amoxicillin		Streptomycin		Erythromycin		Vancomycin	
	7	12.5^{bc}	4	20^{ab}	2	20^{ab}	10	11.25^{bc}	3	19^{ab}
P-value		0.0001		0.0001		0.045		0.049		0.038
Mean standard error		3.351		3.821		4.231		2.986		3.593

Values with different superscript letters in the column mean the significant difference between treatments (P<0.05)

Antibiotic Resistance

Table 4 demonstrates the results of antibiotic resistance for bacterial isolates from Naein traditional dairy product based on the diameter of the zone (mm). Most of the bacteria were sensitive or semi-sensitive to amoxicillin as S3, S4, and S5 were sensitive and isolates S6, S8, and S9 were semi-sensitive to amoxicillin. On the other hand, eight isolates were resistant to vancomycin and cephalexin. Isolates S3, S4, S5, S7, S9, S11, S12, and S14

were found to be resistant to vancomycin and S3, S5, S6, S7, S8, S11, S12, and S14 were resistant to cephalexin.

Table 4. antibiotic resistance of bacterial isolates from Naein traditional dairy product based on the diameter of the zone (mm)

Isolate code	E15 Erythromycin	AMX 25 Amoxicillin	C30 Chloramphenicol	S10 Streptomycin	V30 Vancomycin	CN30 Cefalexin	FM300 Nitrofurantoin
S3	Resistant	Sensitive	Resistant	Semi-sensitive	Resistant	Resistant	Semi-sensitive
S4	Sensitive	Sensitive	Sensitive	Resistant	Resistant	Sensitive	Resistant
S5	Resistant	Sensitive	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant
S6	Resistant	Semi-sensitive	Semi-sensitive	Resistant	Sensitive	Resistant	Resistant
S7	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant
S8	Resistant	Semi-sensitive	Resistant	Sensitive	Semi-sensitive	Resistant	Sensitive
S9	Resistant	Semi-sensitive	Semi-sensitive	Resistant	Resistant	Semi-sensitive	Resistant
S11	Sensitive	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	-
S12	Resistant	Resistant	Resistant	Sensitive	Resistant	Resistant	Sensitive
S14	-	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant	Resistant

Cholesterol Reduction

Results of cholesterol reduction by the bacterial isolates of Naein dairy product after 16 h of incubation at 37°C are shown in Table 5. Isolates S5 and S11 were significantly different from other isolates with reductions of 99% and 98%, respectively (P<0.05). The S8 and S9 with cholesterol reduction of 87% and 80% were not significantly different from S5 and S11 (P>0.05). Isolates S5, S11, and S8 had a suitable resistance to bile salts as could tolerate 1% of bile salts. The S9 and S14 could only tolerate 0.3% bile salt. Isolates S5 and S11 were reported to have suitable tolerance against acid conditions as could tolerate pH=2. Furthermore, isolate S12 was found to be able to tolerate acidic conditions up to pH=2.5. We observed that S5, S11, S8, and S9 has the highest cholesterol reduction levels. Isolate S12 was shown to impose the lowest impact on cholesterol reduction.

Table 5. cholesterol reduction percentage by bacterial isolates from Naein traditional dairy product after 16 h of incubation at 37°C

Bacterium code	Cholesterol reduction percentage	Ranking
S5	99.14^{a}	1
S8	87.32^{ab}	2
S9	80.5^{ab}	3
S11	98.41^{a}	1
S12	71.35^{b}	4
S14	76.28^{b}	3
P-value	0.012	
Mean standard error	5.571	
(Over 95% rank 1, over 85% rank 2, over 75% rank 3, and over 70% rank 4)		

Values with different superscript letters in the column mean the significant difference between treatments (P<0.05)

Table 6 shows the findings of the bile salts hydrolase activity test. In this test, bile-resistant isolates (i.e., S5, S8, S9, S11, and S14), in addition to S12 as a negative control for controlling test accuracy were selected. The obtained results were reported as the measurement of the white zone produced by isolates in mm.

According to our findings, isolates S8, S5, and S11 had orderly the largest zones (P<0.05). Considering the cholesterol reduction test, these results could be

expected because the latter isolates had the highest percentages of cholesterol reduction. Activity of bile acids hydrolyzing enzyme was observed for the isolates, which could reduce blood cholesterol. Therefore, a correlation was suggested between these two features.

Table 6. Bile salts hydrolysis by the bacterial isolates of Naein traditional dairy product based on the diameter of zones

Bacterium code	Zone diameter (mm)	Strong, weak, moderate	Ranking
S5	3.5^{ab}	Strong	2
S8	4^{a}	Strong	1
S9	2.5^{b}	Moderate	4
S11	3^{ab}	Strong	3
S12	1.5^{b}	Weak	6
S14	2.25^{b}	Moderate	5
P-value	0.032		
Mean standard error	0.574		

Values with different superscript letters in the column mean the significant difference between treatments (P<0.05)

Molecular Identification of Bacterial Isolates with Probiotic Characteristics

Bacterial isolates S5, S8, S9, S11, and S14 had the potential for cholesterol reduction and bile salts hydrolysis. Moreover, S3 had higher antimicrobial properties and S7 was highly resistant to pH variations with strong antimicrobial impact. As a result, the aforementioned isolates were investigated using PCR for 16sr RNA for molecular identification. Results of sequencing were compared with the sequences in gene banks, including EzBioCloud (eztaxon) and NCBI. The final findings of sequencing for the evaluated isolates are summarized in Table 7. Consequently, Naein traditional dairy product had diverse genera of Lactobacillus, among which *L. pentosus, L. crustorum, L. brevis*, and *L. fermentum* were identified.

Table 7. Sequence BLAST of ribosomal 16s region of the DNAs of the isolates from Naein traditional dairy product according to the databases of NCBI and eztaxon

Bacterium code	Species in Taxon	Isolate	Similarity (%)	Species in NCBI	Isolate	Similarity (%)
S3	*Lactobacillus pentosus*	DSM 20314 (T)	100	*Lactobacillus Plantarum*	Strain H_1,16S ribosomal RNA gene	100
S5	*Lactobacillus Crustorum*	LMG 23699 (T)	99.93	*Lactobacillus Crustorum*	Strain B481,16S ribosomal RNA gene	100
S7	*Lactobacillus fermentum*	CECT 562 (T)	99.71	*Lactobacillus fermentum*	Strain APBSMLB166,16S ribosomal RNA gene	99.71
S8	*Lactobacillus Pentosus*	DSM 20314 (T)	99.93	*Lactobacillus Plantarum*	Strain PS7319,16S ribosomal RNA gene	100
S9	*Lactobacillus fermentum*	CECT 562 (T)	99.36	*Lactobacillus fermentum*	Strain 10-18 16S ribosomal RNA gene	99.36
S11	*Lactobacillus brevis*	ATCC 14869 (T)	99.86	*Lactobacillus brevis*	Strain NOS7311 16S ribosomal RNA gene	100
S14	*Lactobacillus brevis*	ATCC 14869 (T)	99.93	*Lactobacillus brevis*	Strain SKB1021 16S ribosomal RNA gene	100

Discussion

Evaluation of resistance to acidic conditions revealed that six out of 15 bacterial isolates had a suitable resistance to pH=2.5. Sharifi et al. (2017) investigated probiotic characteristics of the bacteria isolated from traditional yogurt in Yazd, Iran in pH=2.5-3. They reported lower resistance of Bifidobacteria, in comparison with Lactobacilli. In addition, they showed that Lactobacillus isolates were more resistant to acidic conditions than Streptococcus and Enterococcus. Overall, their findings were indicative of the diminished number of all isolates at pH=2.5 after 2 h.

Akbanda *et al*. (2013) demonstrated that at H=2.5, a decrease in the viability of bacteria was remarkable following 2 h, compared to 1 h **(16)**. Consistent with our findings, they revealed that time was effective in the reduction of resistance and viability of isolates. The viability of isolates at pH=2 showed lower viability after

120 min than 60 min. It could be attributed to the higher lysis rate of the bacterial cell wall by the acid in longer contact. Majidzadeh *et al*. (2011) investigated the impact of time and pH on the reduction of isolates activity. They reported that the isolates had a 55%-60% decrease in viability following 2 h of incubation at pH=2, which was in line with the findings of the current study **(17)**.

Results of bile salts resistance assay showed that 60% of the isolates were sensitive to bile salts. Sharifi *et al*. (2017) tested 24 Lactobacillus isolates from traditional yogurt of Yazd, Iran using bovine bile extract 0.3% for 8 h. They reported 10, 2, and 12 isolates as resistant, highly resistant, and sensitive, respectively. Their results are consistent with the present investigation. Hajighassemi *et al*. (2016) recognized five resistant isolates following 8 h of incubation beside 0.3% bile salts and two resistant isolates utilizing 0.7% bile salts **(8)**.

Isolates S8, S9, and S12, which were resistant to pH=2.5 but sensitive to pH=2, were destroyed after 120 min of exposure to gastric simulated conditions. As expected, isolates S7, S11, and S5, which were resistant to pH=2, were the most resistant bacteria to gastric simulated conditions after 2 h of incubation as they indicated 62%, 59%, and 40% viability. Gastric pepsin enzyme affects bacterial cell walls due to proteolytic activity and destroys the bacteria. A study on probiotic characteristics revealed that the viability of L. acidophilus and L. rhamnosus GG had a 60% reduction in gastric simulated conditions under treatment by the whole salt with pepsin enzyme for 120 min.

In intestinal simulated conditions, S6 had the lowest resistance as expected because the viability of this bacterium reached zero after 60 min in gastric simulated conditions and was not resistant to pH=.5. Moreover, this bacterium could not tolerate 0.3% bile salts and was reported as sensitive. Another investigation on the viability of L. rhamnosus GG in intestinal simulated conditions demonstrated that the most reduction in viability occurred after 30 min of exposure to intestinal simulated conditions. This could be attributed to the sudden shock due to bacterial exposure to high pH and bile salts indicating the higher sensitivity of this bacterium to intestinal simulated conditions **(19)**.

Evaluation of antimicrobial effects showed that isolates S9 and S4 were the best options for inhibiting S. typhimurium, S12 and S14 were the best for P. aeruginosa and isolates S3 and S8 were the most effective for E. coli. In addition, the best isolates for the inhibition of S. aureus were S7 and S9 and for C. albicans yeast were S3 and S14. The antimicrobial impact of some Lactobacillus isolates was correlated with pH decrease **(20)**. However, the antimicrobial properties cannot be completed attributed to pH reduction. The secretion of bacteriocins as antibacterial compounds by Lactobacilli is believed to play role in this regard **(21)**.

Numerous studies are still being conducted in this regard. Sharifi *et al*. (2017) reported a strong antimicrobial activity for L. rhamnosus and L. fermentum against the pathogenic bacteria S. typhimurium, S. aureus, and E. coli. An investigation was performed on the antimicrobial activity of Lactobacillus isolates from two samples of traditional yogurt. It was found that L. acidophilus with the mean diameter of 14.68 mm for the zone of inhibition against S. typhimurium and S. aureus along with L. plantarum with the mean diameter of 12.37 mm against P. aeruginosa had the highest antimicrobial activity. The mentioned findings were in line with the results of the present study.

A considerable aspect in terms of the safety of probiotics is antibiotic resistance. This is the potential risk of the transfer of antibiotic resistance genes among Lactobacilli. Following passing acidic conditions and bile in the digestive system, the transfer of antibiotic resistance genes located on plasmid to the flora of the digestive system and even intestinal epithelial cells is possible. As a result, the safety of using such bacteria as probiotics is reduced **(22)**.

A study was performed on the resistance of Lactobacillus isolates from Mazandaran, Iran traditional cheese to the common antibiotics. It was observed that most of the isolates were resistant to streptomycin, vancomycin, and gentamycin, sensitive to amoxicillin, and semi-sensitive to nitrofurantoin **(23)**, which is consistent with our results.

Tissay *et al*. (2014) in a clinical study, reported the influence of L. rhamnosus and L. bulgaricus on the diminish of blood cholesterol in rats. Furthermore, they stated that Pediococcus acidilactici could cause a 20% reduction in serum total cholesterol of rats **(14)**. Shahat *et al*. (2016) evaluated the impact of probiotic isolates from a traditional fermented dairy product on health. These authors demonstrated that in laboratory conditions, isolates L. plantarum and L. brevis could reduce cholesterol **(13)**.

Simultaneous with the enzymatic activity for further hydrolysis of bile salts by the isolates, cholesterol reduction and detoxification occurs in the digestive system, especially the liver. Comparison of the potential for bile salts indicates that the higher the ability of bacteria for hydrolysis of these salts, the better the reduction and detoxification by the digestive system and liver is performed **(24)**

Mirlohi *et al*. (2010) in a clinical study on laboratory mice, noted that L. plantarum was influential in the reduction of serum cholesterol. They considered having bile-hydrolyzing enzyme as one of the factors for cholesterol reduction by probiotic isolates, which caused an 8%-10% decrease in blood cholesterol **(10)**.

Tissay *et al*. (2014) investigated bile salts derived from bovine bile in the diet of mice. They showed that L. acidophilus and L. fermentum led to the highest rate of serum cholesterol reduction, which was in line with the findings of the present study (isolate L. fermentum, S8). They attributed the decrease in serum cholesterol to the production of bile-hydrolyzing enzymes by Lactobacillus isolates **(14)**

Conclusion

According to the findings of the current study, koome is highly potential for isolating probiotic isolates and contains active probiotic isolates. Therefore, in the present investigation, isolates with probiotic characteristics were derived from this fermented dairy product of Naein. Isolates obtained from this product were demonstrated to have diverse potentials for healthy effects on the digestive system, such as having anti-pathogen activity, inducing acidic conditions, and hydrolyzing cholesterol.

Conflict of Interest

The authors declared no conflict of interest.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۵ ـ شماره ۱ ـ بهمن و اسفند ۱۳۹۹

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیل با قابلیت پروبیوتیکی از محصول لبنی سنتی نائین (کومه)

نینا شمشاد[۱]، لیلا روزبه نصیرایی[۲،۳*]، رضا مجیدزاده هروی[۴]

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران
۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران
۳. مدیر مرکز توسعه و تحقیقات شرکت خدمات و مشاوره ای شمس باوران سلامت نور، تهران ایران
۴. استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۶

پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۷

انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

موضوع: میکروب‌شناسی مواد غذایی

نویسندهٔ مسئول:

لیلا روزبه نصیرایی،

استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد واحد نور، نور، ایران

ایمیل:

leila_roozbeh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: کومه یکی از محصولات لبنی تخمیری سنتی از فرآورده‌های شیر گوسفند است که از دیرباز به‌صورت سنتی در روستاهای اطراف منطقه نایین در کیسه‌های پوستی از نوع پوست گوسفند تولید می‌شود. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیل از محصول لبنی سنتی نائین و بررسی ویژگی‌های عملکردی و سلامتی بخش این باکتری‌ها به‌عنوان پروبیوتیک بود.

مواد و روش‌ها: از محیط کشت MRS Agar برای جداسازی اولیهٔ باکتری‌ها استفاده شد. بعد از انجام تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی در نهایت تعداد پانزده کلنی باسیلی شکل، گرم‌مثبت و کاتالاز منفی، جداسازی و آزمون‌های مقاومت به اسید، صفرا و شیره معده و روده، برای بررسی خواص پروبیوتیکی آن‌ها انجام شد. جدایه‌های باکتریایی با خواص پروبیوتیکی مطلوب برای بررسی خواص سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها، با آزمون‌های فعالیت ضدمیکروبی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی بررسی شدند. سپس، هفت جدایهٔ باکتریایی انتخاب شد و قابلیت آن‌ها در کاهش کلسترول و هیدرولیز نمک‌های صفراوی سنجش شد. جدایه‌های انتخاب شده برای تشخیص سویه تعیین توالی شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در بررسی مقاومت به شرایط اسیدی، شش جدایه از ۱۵ جدایه باکتریایی، مقاومت خوبی در pH=۲/۵ نشان دادند. ۶۰٪ جدایه‌ها به نمک صفراوی حساسیت داشتند. جدایه‌های لاکتوباسیلوس شناسایی شده، از مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی برخوردار بوده و فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند. جدایه‌های باکتریایی مورد نظر، قادر به کاهش ۷۰٪ کلسترول محیطی بودند.

نتیجه‌گیری: این تحقیق نشان داد که کومه دارای پتانسیل زیادی برای جداسازی جدایه‌های پروبیوتیکی است و احتمالا مصرف خوراکی جدایه‌های لاکتوباسیلی به‌عنوان مکمل میکروبی دارای اثرات سلامتی بخش است.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک، کومه، لاکتوباسیل، محصول لبنی

کپی‌رایت © مجله میکروب شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

فرآورده‌های تخمیری مانند ماست، کفیر، دوغ، ساورکرات، کامبوجا و سایر محصولات لبنی که از قدیم به‌طور سنتی در میان مردم مورد مصرف بوده، امروزه به علم بیوتکنولوژی نیز راه پیدا کرده است (۱). علم پروبیوتیک درمانی (Probiotic Therapy)، حاصل تکامل این روند در میکروبیولوژی غذایی بوده که به تفسیر اثرات سودمند پروبیوتیک‌ها (ریزارگانیسم‌های زنده موجود در مواد غذایی) در بدن فرد میزبان می‌پردازد (۲). اثرات درمانی و خواص سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها از این جهت که منجر به تحریک رشد میکروارگانیسم‌های مفید روده، کاهش جمعیت باکتری‌های مضر و کمک به مکانیسم‌های دفاعی طبیعی بدن می‌شوند، حائز اهمیت هستند(۳). اثرات سودمند باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از محصولات لبنی سنتی بومی جهت پیشگیری و درمان بیماری‌ها، به اثبات رسیده است و تاکنون، اثرات جانبی منفی ناشی از مصرف آن‌ها به‌عنوان پروبیوتیک مشاهده نشده است (۴). باکتری‌های پروبیوتیک، از گروه باکتری‌های اسید لاکتیک،

گروهی از باکتری‌های گرم‌مثبت هستند که در فلور میکروبی دستگاه گوارش انسان وجود داشته و در پروسه‌های تخمیر مواد غذایی نیز، کاربرد دارند و امروزه به‌عنوان حصار مخاطی، با قابلیت تنظیم پاسخ‌های ایمنی، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵). باکتری‌های پروبیوتیک طبق استاندارد ملی غذایی به این صورت تعریف می‌شود که، نه تنها بایستی در طول مدت زمان ماندگاری غذا زنده بمانند، بلکه باید در طول عبور از اسید معده، آنزیم‌ها و نمک‌های قلیایی صفرا زنده مانده و به محل فعالیت خود (روده) برسند. به همین دلیل، غذاهایی که ادعا می‌شوند دارای اثرات سلامتی‌بخش هستند، باید به هنگام مصرف، حداقل حاوی 10^7 پروبیوتیک زنده، در هر گرم وزنی باشند (۱).

لاکتوباسیلوس‌ها برای اولین بار از شیر جداسازی شدند و امروزه پروبیوتیک‌ها در صنایع غذایی، به‌عنوان اجزایی از محصولات لبنی تخمیر شده، مانند کفیر و دوغ بوده و بیش از ۷۰ محصول حاوی باکتری‌های لاکتیکی، از جمله خامه ترش، شیر پودر شده و نوشیدنی‌های تخمیری، در سرتاسر جهان، تولید و عرضه می‌شود (۱). کومه[1] یک محصول سنتی لبنی از فرآورده‌های شیر گوسفند است. این محصول به صورت سنتی در روستاهای اطراف منطقه نایین در استان اصفهان از دیرباز در کیسه‌های پوستی از نوع پوست گوسفند تولید می‌شود. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد فیزیکوشیمیایی، میکروبیولوژیکی و نیز عدم وجود نمک در این محصول لبنی، می‌توان کومه را به‌عنوان یکی از برترین محصولات لبنی سنتی با دوره نگه‌داری طولانی معرفی کرد.

Sharifi و همکاران (۲۰۱۷) ۹۶ نمونه ماست‌های محلی گاوی، گوسفندی و بزی را بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان دادند که ۴۷ نمونه، حاوی باکتری‌های لاکتیکی با خواص پروبیوتیکی از نوع *لاکتوباسیلوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بود (۶). Famouri و همکاران نیز، خواص درمانی و سلامتی بخش *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* ایزوله شده از ۱۰ نمونه محصول لبنی سنتی تخمیری را مورد بررسی قرار دادند. کاهش کلسترول سرم خون و کاهش مسمومیت فلزات سنگین، از نتایج مطلوب به دست آمده، بود (۷). Handa و همکاران (۲۰۱۶) نیز، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک، از ۲ نمونه نوشیدنی تخمیری سنتی بر پایه غلات را بررسی نمودند. در این بررسی، باکتری‌های لاکتیکی با خواص پروبیوتیکی، که شامل *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بودند، از این نوشیدنی جداسازی و شناسایی شدند و خواص درمانی و سلامتی بخش آنها، مورد تایید قرار گرفت (۲). هدف از انجام این تحقیق، جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیل با قابلیت پروبیوتیکی از محصول لبنی سنتی نائین است. از آنجا که این جنس از باکتری‌ها در صنایع مختلف غذایی، دارویی و مکمل سازی مورد استفاده قرار می‌گیرند، شناخت و طبقه‌بندی این گونه از باکتری‌ها در هر محیطی اطلاعات با ارزشی را در اختیار محققان قرار می‌دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و کشت میکروبی

در این تحقیق، تعداد ۵ نمونه کومه گاوی و ۳ نمونه کومه گوسفندی از روستاهای اطراف شهر نائین جمع آوری شد. سپس، جهت جداسازی، مقدار ۱۰ گرم از هر نمونه در ۹۰ میلی‌لیتر رقیق کننده، هموژن و یکنواخت شد و بعداز تهیه سری رقت، بر سطح محیط کشت اختصاصی MRS Agar به مدت ۲۴ ساعت، داخل گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شدند. کلنی‌های رشد یافته بر سطح محیط کشت، جهت جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس از سایر ارگانیسم‌ها و بررسی مرفولوژی، مورد آزمون قرار گرفتند. بدین منظور، هر کلنی بر روی محیط کشت، جهت رسیدن به تک کلنی و خالص‌سازی، کشت خطی داده شد. سپس، کشت خالص‌سازی شده به‌عنوان کشت ذخیره جهت آزمایش‌ها نگهداری گردید (۸).

جداسازی باکتری‌های لاکتوباسیل

آزمون کاتالاز برای بررسی تولید آنزیم کاتالاز، توسط باکتری‌های مورد نظر بررسی شد. جهت انجام این تست، با استفاده از لوپ استریل، از کلنی مورد نظر، بر لام استریل قرار داده و با یک قطره محلول آب اکسیژنه ۳٪ (معرف کاتالاز)، مخلوط گردید. در صورت عدم تولید حباب، می‌توان گفت باکتری مورد نظر، توانایی تولید آنزیم کاتالاز را ندارد و کاتالاز منفی است. در انتهای این مرحله، کلنی‌ها با مرفولوژی مختلف از لاکتوباسیل‌ها که همگی باسیلی شکل، کاتالاز منفی و گرم‌مثبت بودند، کدگذاری شده و برای ارزیابی خصوصیات پروبیوتیکی، آزمایش شدند و کشت سطحی از نمونه‌های کدگذاری شده، تهیه شد (9).

ارزیابی پروبیوتیکی

مقاومت به شرایط اسیدی و صفرا

بقای میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت مایع با pH های اسیدی ۲، ۲/۵ و ۳ که مطابق با شرایط دستگاه گوارشی بود، بررسی شد و پس از گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷°C و زمان‌های ۱ و ۲ ساعت تعداد میکروارگانیسم‌های باقی مانده شمارش گردید و بصورت درصدی از

[1] Kwomeh

تعداد اولیه بیان شد. بررسی مقاومت و میزان کاهش رشد میکروارگانیسم در حضور نمک‌های صفراوی (بایل اگزالات) با غلظت ۰٪/۷ و ۱٪ با زمان گرمخانه‌گذاری ۸ ساعت در دمای ۳۷°C درجه گرمخانه، بررسی شد. بررسی مقاومت میکروارگانیسم‌ها در شرایط معده و روده، با قرارگیری آن‌ها در محیط‌های کشت مایع شبیه‌سازی‌شده معده (۶/۲۳ گرم کلرور سدیم، ۰/۲۲۹ گرم کلرور کلسیم، ۲/۲۹ گرم کلرور پتاسیم، ۱/۲ گرم بی کربنات سدیم، آنزیم پپسین با غلظت ۰/۳٪ و۰/۲±۲= pH) و روده (۱/۲۸ گرم کلرور سدیم، ۰/۲۳۹ گرم کلرور پتاسیم، ۶/۴ گرم بی کربنات کلسیم، ۰/۵٪ اکس‌گال و آنزیم پانکراتین، با غلظت نهایی ۰/۱٪ و ۸ =pH) انجام گردید، سپس کشت خطی بر روی محیط کشت آگاردار انجام شد و در نهایت، بعد از گرمخانه‌گذاری در دما ۳۷°C و زمان یک شب، تعداد کلنی‌ها بر روی پلیت شمارش گردید (۸).

شناسایی باکتری‌های اسیدی ساز

تولید اسید توسط میکروارگانیسم‌ها در محیط کشت، از طریق بررسی کاهش pH محیط، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C انجام شد و باکتری‌هایی که نسبت به pH اولیه (۶/۲۲)، pHکمتری داشتند، به‌عنوان میکروارگانیسم‌های اسید ساز شناسایی گردیدند (۱۰).

بررسی فعالیت ضد میکروبی

بررسی توانایی جدایه‌های مورد نظر در تولید ترکیبات ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای استاندارد، با بررسی وجود هاله شفاف ممانعت از رشد لایه آگار نرم انجام شد. در این روش، ۲۰۰ ماکرولیتر از کشت فعال باکتری بیماری‌زای مورد نظر، به لوله فالکون حاوی محیط کشت نوترینت آگار ۱ ٪ (آگار نرم) تلقیح گردید و بعد از خنک شدن، به پلیت حاوی نوترینت آگار ۱/۵٪ اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه، داخل یخچال قرار گرفت. سپس، دیسک‌های بلانک استریل آغشته به محلول رویی جدایه مورد نظر، با ضربه آرامی روی پلیت تثبیت گردید و به مدت ۲۰ دقیقه، داخل یخچال و سپس به گرمخانه ۳۷°C منتقل شد. پس از سپری شدن مدت زمان مناسب گرمخانه‌گذاری، هاله ایجاد شده، با خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. وجود هاله عدم رشد، به‌عنوان اثر ضد میکروبی علیه میکروارگانیسم بیماری زای مورد ادعا گزارش گردید (۱۱).

بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی

بررسی حساسیت یا مقاومت باکتری‌های پروبیوتیکی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌های رایج علم پزشکی بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، بررسی گردید. ابتدا کشت فعال از باکتری‌های پروبیوتیکی، تهیه گردید. سپس، از محیط کشت MRS Agar ۱ درصد استریل، به مقدار ۴ میلی لیتر، داخل هر لوله فالکون، تقسیم شد. بعد از اطمینان از خنک شدن محیط کشت، ۲۰۰ ماکرولیتر از کشت تازه و فعال باکتری پروبیوتیکی، داخل هر لوله فالکون تلقیح گردید و به خوبی مخلوط شد. پلیت‌های حاوی MRS Agar ۱٪/۵ تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه، در دمای اتاق، قرار داده شدند تا با محیط هم دما گردند. سپس، محیط کشت حاوی باکتری تهیه شده، به آرامی به پلیت اضافه گردید و به مدت نیم ساعت، داخل یخچال قرار گرفت تا باکتری جذب محیط گردد. سپس، جهت قرار دادن دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی، پلیت‌ها از یخچال خارج شد و پس از هم‌دما شدن با محیط، دیسک‌های آنتی بیوتیک (با قطر ۰/۷ سانتی‌متر) استریل، به آرامی روی پلیت قرار داده شد و با ضربه آرامی روی محیط کشت تثبیت گردید و به مدت ۲۰ دقیقه، داخل یخچال قرار گرفت. سپس، پلیت‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس، گرمخانه‌گذاری شدند. از ۸ ساعت تا ۱۲ ساعت، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها، مرتبا بررسی شد و قطر هاله نهایی، با خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی‌متر بیان شد. نتیجهٔ آزمون، طبق اندازه قطر هاله‌های ایجاد شده، به‌صورت مقاوم، نیمه حساس و حساس گزارش گردید (۱۲).

آزمون کاهش کلسترول

برای بررسی توانایی هیدرولیز کلسترول توسط میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه در محیط کشت حاوی کلسترول اگزالات، ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتراز سوسپانسیون میکروارگانیسم در محیط مایع، به ۲۰ میلی‌لیترمحیط کشت حاوی کلسترول اگزالات (۱۰۰ µg/mL)، تلقیح شد و در ۳۷°C درجه سانتی گراد، به مدت ۱۶ ساعت، گرمخانه‌گذاری شد. سپس، لوله‌ها با دور ۸۰۰۰ RPM ، به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی به لوله شیشه‌ای منتقل و با ۳ میلی‌لیتراتانول ۹۵٪ مخلوط و سپس، ۲ میلی‌لیتر پتاسیم هیدروکساید ۵۰ ٪ به آن اضافه شد. پس از افزودن هر ماده، ترکیب حاصله به مدت ۱ دقیقه ورتکس و همگن گردید. سپس، لوله‌ها در بن ماری ۶۰°C، به مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد و در دمای اتاق، سرد گردید. به هر لوله، به آرامی ۵ میلی‌لیتر هگزان افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس گردید و به آنها ۳ میلی‌لیترآب مقطر افزوده و مجدد به مدت ۱ دقیقه ورتکس شد. سپس، لوله‌ها را در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه و یا تا زمانی که تفکیک کامل فاز (فاز آبی و فاز آلی) انجام شود، به حال خودگذاشته شد. ۲/۵ میلی‌لیتراز لایه هگزان (فاز بالایی)، در لوله تمیز ریخته شد و هگزان، در دمای ۶۵°C در بن ماری تبخیر شد. مایع باقیمانده در لوله‌ها ، با ۴ میلی‌لیتر معرف O–فتال آلدئید مخلوط

شد و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد و سپس، ۲ میلی‌لیتراز اسید سولفوریک غلیظ به هر لوله افزوده و مخلوط گردید و به مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق، قرار گرفت. جذب نوری نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر در مقابل بلانک قرائت گردید (۱۳).

آزمون فعالیت هیدرولازی نمک صفراوی

بررسی هاله یا رسوب دزوکسی کولیک اسید، در اطراف کلنی‌ها در محیط کشت حاوی نمک سدیم اسیدهای صفراوی بررسی گردید. ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروارگانیسم را روی سطح پلیت حاوی MRS آگار کشت سطحی داده و در دما و زمان مناسب گرمخانه‌گذاری شدند. در صورت فعالیت هیدرولازی، رسوب سفید و هاله‌های پراکنده در اطراف کلنی‌ها به وضوح قابل مشاهده است. در صورت عدم مشاهده و یا عدم وضوح هاله، می‌توان ۰/۰۳۷٪ کلرید کلسیم، به محیط کشت نمونه، اضافه کرد و از دیسک‌های بلانک آغشته به ۱۰ ماکرولیتر سوسپانسیون باکتری، بر روی سطح پلیت استفاده کرد. هاله، به صورت رسوب سفید در اطراف دیسک، نشان از هیدرولیز نمک صفراوی، توسط باکتری مورد نظر را دارد (۱۴).

شناسایی جدایه‌های انتخاب شده از آزمون‌های پروبیوتیکی

هفت جدایه‌ای که در آزمون‌های پروبیوتیکی فوق برتری نسبی به سایر جدایه‌ها داشتند با تعیین توالی DNA در ناحیه 16s ریبوزمی شناسایی شدند. قطعه مزبور به روش واکنشهای زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیان، مدل پالم سایکلر (Corbett Life Science Pty. Ltd., Australia) تکثیر شد. از پرایمر عمومی با توالی پیشرو 5′GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3′ و پسرو 5′GAA AGG AGG TGA TCC AGC CG 3′ برای تکثیر قطعه مورد نظر استفاده گردید (۱۵). مراحل واکنش بصورت زیر دنبال شد: ۹۵°C در ۲ دقیقه و ۳۵ سیکل ۹۵°C در ۴۵ ثانیه، ۵۳°C در ۴۵ ثانیه، ۷۲°C در ۶۰ ثانیه و مرحله نهایی ۷۳°C در ۳ دقیقه. محصول واکنش روی ژل آگاروز ۰/۸ ٪ الکتروفورز شد و قطعه از ژل استخراج شد و بعد از بررسی صحت طول باند و سپس، تعیین غلظت برای توالی یابی، به شرکت Microsynth سوئیس، ارسال شد.

تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمایش‌های در این مطالعه، در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار توسط نرم افزار SAS نسخه ۹/۲ تجزیه و تحلیل گردید. از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ برای رسم نمودارها استفاده شد.

یافته‌ها

مقاومت به نمک‌های صفراوی و اسید

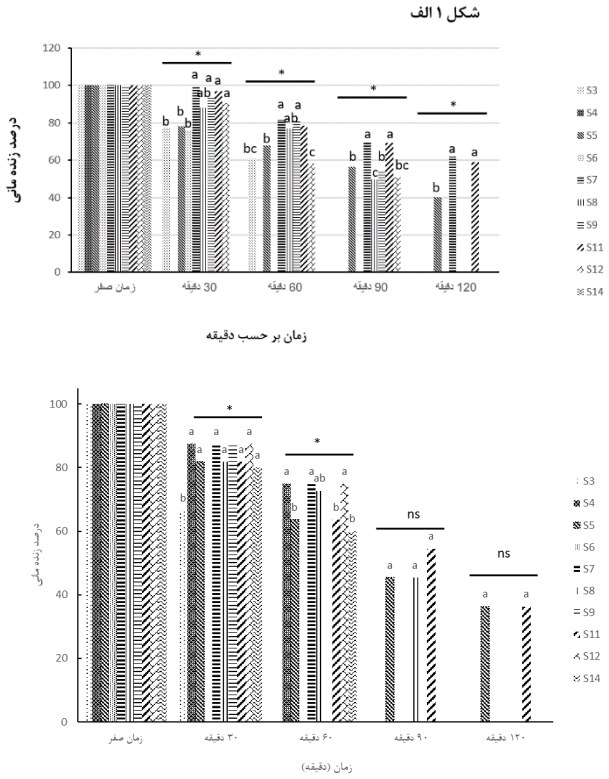
نتایج حاصل از آزمون کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکپی جدایه‌ها نشان دادند که تعداد ۱۵ کلنی، همگی باسیلی شکل، گرم‌مثبت و کاتالاز منفی بوده که برای بررسی آزمایش‌های پروبیوتیکی انتخاب و به صورت کدهای S1 الی S15 کدگذاری شدند. نتایج حاصل شده در آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی در غلظت‌های ۰/۳٪، ۰/۷٪ و ۱٪ بعد از ۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، در جدول ۱ مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از بررسی اکسگال ۰/۳ ٪ برای ۱۵ جدایه مورد نظر، حاکی از این است که، جدایه S5 بسیار مقاوم، جدایه‌های S8 ، S9 ، S11 و S14 مقاوم و جدایه‌های S1 ، S2 ، S3 ، S4 ، S6 ، S7 ، S10 ، S13 و S15 حساس بودند. در محیط حاوی غلظت‌های ۰/۷٪ و ۱٪ نمک صفراوی، جدایه‌های S8 ، S5 و S11 مقاوم و جدایه‌های S9 و S14 حساس گزارش شدند. لذا، نتیجه حاصل، حاکی از مقاومت ۲۰ ٪ از جدایه‌ها به نمک صفراوی در غلظت‌های ۰/۷٪ و ۱٪ است. از این رو جدایه‌های S8، S5 و S11 به‌عنوان جدایه‌های مقاوم به صفرا، شناخته شدند.

آزمایش مقاومت به اسید نشان داد که جدایه‌های S15، S14، S13، S10، S2 و S1 در شرایط pH=۳، بعد از یک ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C، از مقاومت کافی برخوردار نبوده و درصد زنده‌مانی صفر داشتند. در مقابل، جدایه‌های S11 و S12 با بیشترین درصد زنده‌مانی، حدود ۹۶٪، بعد از یک ساعت گرمخانه‌گذاری، بیشترین درصد زنده‌مانی را داشتند و بعد از آنها، جدایه‌های S9، S8، S7، S6، S5، S4 و S3 با درصد زنده‌مانی ۵۵ تا ۶۰٪، درصد زنده‌مانی تقریبا مشابهی داشتند. جدایه‌های مقاوم در این مرحله، جهت بررسی با pH =۲/۵ مورد آزمون قرار گرفتند. کمترین درصد زنده‌مانی، بعد از دوساعت گرمخانه‌گذاری در pH=۲/۵، متعلق به جدایه S12 و بیشترین میزان، متعلق به S9 بوده است. جدایه‌های مقاوم در این مرحله، برای بررسی با pH =۲ ، تست شدند. نتایج نشان داد که مقاوم‌ترین باکتری‌ها به pH اسیدی جدایه‌های S11، S7 و S5 بودند.

جدول ۱. ضریب بازدارندگی نمونه‌ها در آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی ۰/۳ ، ۰/۷ و ۱ درصد بعد از ۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس

کد باکتری	ضریب بازدارندگی ٪ ۰/۳	نتیجهٔ نهایی	ضریب بازدارندگی ٪ ۰/۷	نتیجهٔ نهایی	ضریب بازدارندگی ٪۱	نتیجهٔ نهایی
S1	۱	حساس	–	–	–	–
S2	۰/۹۱	حساس	–	–	–	–
S3	۱	حساس	–	–	–	–
S4	۱	حساس	–	–	–	–
S5	۰/۱۹	مقاومت بالا	۰/۳۹	مقاوم	۰/۱۴	مقاوم
S6	۱	حساس	–	–	–	–
S7	۰/۸۴	حساس	–	–	–	–
S8	۰/۳۱	مقاوم	۰/۲۹	مقاوم	۰/۲۸	مقاوم
S9	۰/۳۷	مقاوم	۰/۹۸	حساس	۰/۷۴	حساس
S10	۱	حساس	–	–	–	–
S11	۰/۴۳	مقاوم	۰/۲۴	مقاوم	۰/۴۳	مقاوم
S12	۰/۸۵	حساس	–	–	–	–
S13	۰/۵۳	حساس	–	–	–	–
S14	۰/۲۴	مقاوم	۰/۶۲	حساس	۱	حساس
S15	۱	حساس	–	–	–	–

آزمون مقاومت به شیرهٔ معده، در زمان صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، بررسی شد (شکل ۱الف). در این آزمون، منتخب‌های آزمون اسیدی، S5، S7 و S11 و همین طور، منتخب‌های مرحله مقاومت صفراوی، S5، S8 و S11 مورد آزمون قرار گرفتند. البته S14 نیز به دلیل مقاوم بودن به صفرای ۰/۳٪ و جدایه‌های S3، S4، S6 ، S9 و S12 نیز، به دلیل مقاومت به pH=۳ ، در این آزمون، مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به‌دست‌آمده در شکل ۱ ارائه شده است. همان طور که مشاهده می‌شود، جدایه‌های S4، S14 و S6 کمترین مقاومت، نسبت به شرایط شبیه سازی شده معده را داشتند. به‌طوری‌که، بعد از ۳۰ دقیقه، درصد زنده‌مانی به صفر رسیده است. جدایه‌های S8، S9 و S12 که مقاومت به pH=۲/۵ داشتند، ولی به pH=۲ حساس بودند، بعد از ۱۲۰ دقیقه مجاورت با شرایط شبیه سازی شده معده، کاملا از بین رفتند. جدایه‌های مقاوم به pH=۲ که شامل S7، S11 و S5 بودند مقاوم‌ترین باکتری‌ها به شرایط شبیه‌سازی‌شده معده، بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری نیز بودند ولی جدایه های S7 و S11 به‌طور معنی‌داری زنده‌مانی بالاتر از S5 بودند ($P<۰/۰۵$). به‌طوری‌که، به ترتیب، ۶۲٪ ، ۵۹٪ و ۴۰٪ زنده‌مانی از خود نشان دادند.



شکل۱. درصد زنده‌مانی نمونه‌ها در شرایط شبیه‌سازی‌شده شیره معده (الف) و شیره روده (ب) طی مدت ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس. حروف کوچک مشابه‌روی ستون ها اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P<۰/۰۵$).

مقاومت به شیرهٔ روده، در زمان صفر، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بررسی شد (شکل ۱ب). همان‌طورکه مشاهده می‌شود، جدایه S6 کمترین مقاومت به شرایط شبیه‌سازی‌شده روده را داشت، به‌طوری که بعد از ۳۰ دقیقه، درصد زنده‌مانی آن، به صفر رسید. بعد از گذشت ۶۰ دقیقه، درصد زنده‌مانی جدایه‌های S3 و S9 به صفر رسید. در این مطالعه، جدایه S3 به غلظت صفراوی ۰/۳٪ و جدایه S9 به غلظت ۰/۷٪ حساس گزارش شده بود. بعد از ۹۰ دقیقه، بقای نمونه‌های S4، S7، S12 و S14 به صفر رسید، که همگی به جز S14 به صفرای ۰/۳٪ حساس بودند و S14 نیز، به صفرای ۰/۷٪ حساس گزارش شده بود. در نهایت، بعد از گذشت ۱۲۰دقیقه، جدایه‌های S5 و S11 با کاهش ۵۰٪ زنده‌مانی، قادر به تحمل شرایط شبیه سازی شده روده بوده ولی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر از نظر درصد بقا نداشتند ($P>0/05$). بقای جدایه S8 بعد از ۱۲۰ دقیقه، به صفر رسید، که نشان از مقاومت کمتر آن، نسبت به S5 و S11 بود.

نتایج آزمون توانایی کاهش pH محیط، در جدول ۲، قابل مشاهده می باشد. جدایه‌های S7 و S10 به ترتیب بیشترین و کمترین کاهش pH در محیط را داشتند. جدایه‌های S3، S4 و S5 به لحاظ آماری تفاوتی با S7 نداشتند ($P>0/05$).

جدول ۲. درصدکاهش pH محیط توسط ایزوله های باکتریایی از محصول لبنی سنتی نائین بعد از ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

کد باکتری	pH نهایی	درصد کاهش pH	رتبه بندی
S1	۵/۶۷	۸/۸ de	۱۳
S2	۴/۹۸	۱۹/۹ cd	۱۱
S3	۳/۶۳	۴۱/۶ ab	۳
S4	۳/۷۸	۳۹/۲ ab	۵
S5	۳/۶۷	۴۰/۹ ab	۴
S6	۴/۶۰	bcd۲۶	۸
S7	۲/۶۷	a ۵۷	۱
S8	۵/۸۳	de۶/۲	۱۴
S9	۴/۱۹	bc۳۲/۶	۷
S10	۵/۹۴	e۴/۵	۱۵
S11	۳/۳۹	b۴۵/۴	۲
S12	۵/۱۷	d۱۶/۸	۱۲
S13	۳/۹۱	bc۳۷/۱	۶
S14	۴/۷۸	bcd۲۳/۱	۹
S15	۴/۸۹	bcd۲۱/۳	۱۰
ارزش *P*		۰/۰۰۱	
میانگین اشتباه استاندارد		۴/۰۲۳	

حروف کوچک مشابه‌روی ستون ها اختلاف معنی داری با هم با هم ندارند ($P<0/05$).

فعالیت ضد میکروبی

نتایج آزمون فعالیت ضد میکروبی در جدول ۳ قابل مشاهده است. بهترین خاصیت ضدمیکروبی و به عبارتی، بهترین گزینه برای مهار باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم*، جدایه‌های S9 و S4 بودند که تفاوت معنی‌داری با سایر جدایه‌ها در مهار این پاتوژن نشان دادند ($P<0/05$). باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* توسط جدایه‌های S4، S5، S12 و S14، به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر جدایه‌ها مهار شد ($P<0/05$).

جدایه‌های S3، S6 و S8 باکتری *اشرشیاکلی* را به‌طور معنی‌داری مهار کردند($P<۰/۰۵$). باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط جدایه S7 و در نهایت، مخمر *کاندیدا آلبیکنس* توسط جدایه‌های S3 و S14 به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر جدایه‌ها مهار شده بودند ($P<۰/۰۵$).

جدول ۳. فعالیت ضد میکروبی و رتبه‌بندی ایزوله‌ها بر حسب قطر هاله (میلی‌متر) در مقابل باکتری‌های بیماری زا

کد باکتری	*Salmonella typhimurium*		*Escherichia coli*		*Staphylococcus aureus*		*Pseudomonas aeruginosa*		*Candida albicans*	
	رتبه‌بندی	قطر هاله	رتبه‌بندی	قطر هاله	رتبه‌بندی	قطر هاله	رتبه‌بندی	قطر هاله	رتبه‌بندی	قطر هاله
S3	۸	^{bc}۱۲	۲	^{a}۲۳/۵	۶	^{ab}۱۷	۵	^{ab}۱۹/۵	۲	^{a}۲۳
S4	۲	^{a}۲۱/۵	۱۰	^{bc}۹	۴	^{ab}۱۹	۴	^{a}۲۱/۵	۱۰	^{b}۷/۵
S5	۵	^{bc}۱۵	۸	^{abc}۱۳	۸	^{c}۹	۳	^{a}۲۲	۶	^{ab}۱۷/۵
S6	۱۰	^{cd}۸/۵	۳	^{a}۲۱/۷۵	۷	^{bc}۱۳	۶	^{ab}۱۸/۷۵	۹	^{b}۸
S7	۶	^{bc}۱۴/۲۵	۹	^{ab}۱۲/۲۵ c	۱	^{a}۲۲	۸	^{ab}۱۸	۴	^{ab}۱۸/۷۵
S8	۴	^{ab}۱۸/۵	۱	^{a}۲۵	۱۰	^{c}۸	۹	^{ab}۱۴	۷	^{ab}۱۷
S9	۱	^{a}۲۳/۵	۶	^{ab}۱۸	۳	^{ab}۱۹/۵	۷	^{ab}۱۸/۵	۵	^{ab}۱۸/۵
S11	۹	^{bc}۱۰	۱۱	^{c}۶/۵	۱۱	^{c}۷/۵	۱۱	^{c}۷/۵	۸	^{b}۱۴
S12	۳	^{ab}۱۹	۵	^{ab}۱۹	۵	^{ab}۱۸/۵	۱	^{a}۲۵	۱۱	^{b}۷
S14	۱۱	^{cd}۷/۲۵	۷	^{abc}۱۷/۵	۹	^{c}۸/۵	۲	^{a}۲۲/۵	۱	^{a}۲۳/۵
آنتی‌بیوتیک	Cefalexin		Amoxicilin		Stereptomycin		Erythromycin		Vancomycin	
	۷	^{bc}۱۲/۵	۴	^{ab}۲۰	۲	ab۲۰	۱۰	^{bc}۱۱/۲۵	۳	^{ab}۱۹
ارزش *P*		۰/۰۰۰۱		۰/۰۰۰۱		۰/۰۴۵		۰/۰۴۹		۰/۰۳۸
میانگین اشتباه استاندارد		۳/۳۵۱		۳/۸۲۱		۴/۲۳۱		۲/۹۸۶		۳/۵۹۳

حروف کوچک مشابه‌روی ستون ها اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P<۰/۰۵$).

مقاومت آنتی بیوتیکی

نتایج مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه‌های باکتریایی از محصول لبنی سنتی نائین بر حسب قطر هاله (میلی‌متر)در جدول۴، قابل مشاهده است. بیشتر باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین حساس و نیمه حساس بودند. به‌طوریکه جدایه‌های S3، S4 و S5 حساس به آموکسی‌سیلین و جدایه‌های S6، S8 و S9 نیمه حساس به آموکسی‌سیلین بودند. اما از جدایه‌های مورد بررسی، ۸ جدایه به آنتی بیوتیک ونکومایسین و سفالکسین مقاومت نشان دادند. جدایه‌های S3، S4، S5، S7، S9، S11، S12 و S14 مقاوم به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین و جدایه‌های S3، S5، S6، S7، S8، S11، S12 و S14 مقاوم به آنتی‌بیوتیک سفالکسین بودند.

کاهش کلسترول

نتایج حاصل شده از آزمون کاهش کلسترول توسط جدایه‌های باکتریایی از محصول لبنی سنتی نائین بعد از ۱۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه، در جدول ۵ مشاهده می‌شود. جدایه‌های S5 و S11 با درصد کاهش کلسترول بترتیب ۹۹ و ۹۸ درصد به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر سویه‌ها تفاوت معنی‌داری داشتند ($P<۰/۰۵$)، S8 و S9 با درصد کاهش کلسترول به ترتیب ۸۷ و ۸۰ درصد تفاوت معنی‌داری را نسبت به دو سویه S5 و S11 نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). جدایه‌های S5، S11 و S8 از مقاومت خوبی در برابر نمک‌های صفراوی برخوردار بود، به‌طوری که، قادر به تحمل نمک‌های صفراوی، با غلظت ۱٪ بودند. جدایه‌های S9 و S14 فقط قادر به تحمل غلظت نمک صفراوی ۰/۳٪ بودند. جدایه‌های S5 و S11 مقاومت خوبی در برابر شرایط اسیدی داشته، به‌طوری‌که، قادر به تحمل شرایط اسیدی، با pH=۲ بودند. جدایه

S12 قادر به تحمل شرایط اسیدی تا pH =۲/۵ بود. در این آزمون نیز، جدایه‌های S5، S11 و S8 ، سپس، S9 به ترتیب، بیشترین درصد کاهش کلسترول را نشان دادند. جدایه S12 کمترین اثر را در کاهش درصد کلسترول داشت.

جدول ۴. مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های باکتریایی از محصول لبنی سنتی نائین بر حسب قطر هاله (میلی‌متر)

کد جدایه	E15 Erythromycin	AMX 25 Amoxicilin	C30 Chloramphenicol	S10 Stereptomycin	V30 Vancomycin	CN30 Cefalexin	FM300 Nitrofurantoin
S3	مقاوم	حساس	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس
S4	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم
S5	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
S6	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم
S7	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
S8	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	حساس	نیمه حساس	مقاوم	حساس
S9	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم
S11	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	-
S12	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	حساس
S14	-	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

جدول ۵. درصد کاهش کلسترول توسط ایزوله های باکتریایی از محصول لبنی سنتی نائین بعد از ۱۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

کد باکتری	درصد کاهش کلسترول	رتبه‌بندی
S5	^{a}۹۹/۱۴	۱
S8	^{ab}۸۷/۳۲	۲
S9	^{ab}۸۰/۵۰	۳
S11	^{a}۹۸/۴۱	۱
S12	^{b}۷۱/۳۵	۴
S14	^{b}۷۶/۲۸	۳
ارزش P	۰/۰۱۲	
میانگین اشتباه استاندارد	۵/۵۷۱	
(بالای ۹۵ ٪ رتبه ۱، بالای ۸۵ ٪ رتبه ۲، بالای ۷۵ ٪ رتبه ۳ و بالای ۷۰ ٪ رتبه ۴)		

حروف کوچک مشابه‌روی ستون ها اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P<۰/۰۵$).

نتایج آزمون فعالیت هیدرولازی نمک‌های صفراوی در جدول ۶ قابل مشاهده است. در این آزمون نیز، مانند روش کاهش کلسترول، جدایه‌های مقاوم به صفرا (S5، S8، S9، S11 و S14) و همچنین، S12 نیز، به‌عنوان کنترل منفی، جهت کنترل صحت آزمون، انتخاب گردیدند. نتایج حاصل شده، طبق اندازه‌گیری هاله سفید رنگ تولید شده، توسط جدایه‌ها، بر حسب میلی‌متر، گزارش گردید. جدایه‌های S8، S5 و S11 به ترتیب، بیشترین قطر هاله تولیدی را داشتند ($P<۰/۰۵$). بر اساس آزمون کاهش کلسترول این نتیجه، دور از انتظار نبود زیرا، جدایه‌های فوق در آن آزمون، بیشترین درصد کاهش کلسترول را، داشتند. در جدایه‌هایی که قادر به کاهش کلسترول سرم خون هستند، فعالیت آنزیم هیدرولیزکننده اسیدهای صفراوی، جهت هیدرولیز نمک‌های صفراوی مشاهده شد، بنابراین یک همبستگی بین این دو صفت پیشنهاد شد.

شناسایی مولکولی باکتری‌های ایزوله با خواص پروبیوتیکی

جدایه‌های باکتریایی S5، S8، S9، S11 و S14 قابلیت کاهش کلسترول و هیدرولیز نمک‌های صفراوی را داشته و همچنین، S3 به

دلیل خاصیت ضد میکروبی بیشتر و S7 به دلیل مقاومت زیاد به pH و خاصیت ضدمیکروبی قوی، جهت شناسایی ملکولی، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 16sr RNA مورد بررسی قرار گرفتند، نتایج تعیین توالی، با توالی‌های موجود در بانکهای اطلاعات ژن (eztaxon) EzBioCloud's و NCBI مقایسه گردید، که نتایج توالی‌یابی نهایی جدایه‌های مورد بررسی، در جدول ۷ قابل مشاهده است. بر این اساس، محصول لبنی سنتی نائین، حاوی جنس‌های مختلفی از جنس باکتری لاکتوباسیلوس بوده،که گونه های *لاکتو باسیلوس پنتوسوس*، *کراستارم*، *برویس* و *فرمنتوم*، شناسایی گردیدند.

جدول ۶. فعالیت هیدرولازی نمک های صفراوی بر حسب قطر هاله توسط ایزوله‌های باکتریایی از محصول لبنی سنتی نائین

کد باکتری	قطر هاله (mm)	قوی، ضعیف، متوسط	رتبه بندی
S5	^{ab}۳/۵	قوی	۲
S8	^{a}۴	قوی	۱
S9	^{b}۲/۵	متوسط	۴
S11	^{ab}۳	قوی	۳
S12	^{b}۱/۵	ضعیف	۶
S14	^{b}۲/۲۵	متوسط	۵
ارزش p	۰/۰۳۲		
میانگین اشتباه استاندارد	۰/۵۷۴		

حروف کوچک مشابه‌روی ستون ها اختلاف معنی داری با هم ندارند ($P<$۰/۰۵).

جدول۷. نتایج بلاست توالی ناحیه 16s ریبوزمی DNA ایزوله‌های محصول لبنی سنتی نائین بر اساس بانک‌های اطلاعاتیeztaxon وNCBI

کد باکتری	گونهٔ مشخص‌شده در Taxon	جدایه	شباهت (%)	گونهٔ مشخص‌شده در NCBI	جدایه	شباهت (%)
S3	*Lactobacillus Pentosus*	DSM 20314 (T)	۱۰۰	*Lactobacillus Plantarum*	Strain H_1 ,16S ribosomal RNA gene	۱۰۰
S5	*Lactobacillus Crustorum*	LMG 23699 (T)	۹۹/۹۳	*Lactobacillus Crustorum*	Strain B481 ,16S ribosomal RNA gene	۱۰۰
S7	*Lactobacillus fermentum*	CECT 562 (T)	۹۹/۷۱	*Lactobacillus fermentum*	Strain APBSMLB166,16S ribosomal RNA gene	۹۹/۷۱
S8	*Lactobacillus Pentosus*	DSM 20314 (T)	۹۹/۹۳	*Lactobacillus Plantarum*	Strain PS7319 ,16S ribosomal RNA gene	۱۰۰
S9	*Lactobacillus fermentum*	CECT 562 (T)	۹۹/۳۶	*Lactobacillus fermentum*	Strain 10-18 16S ribosomal RNA gene	۹۹/۳۶
S11	*Lactobacillus brevis*	ATCC 14869 (T)	۹۹/۸۶	*Lactobacillus brevis*	Strain NOS7311 16S ribosomal RNA gene	۱۰۰
S14	*Lactobacillus brevis*	ATCC 14869 (T)	۹۹/۹۳	*Lactobacillus brevis*	Strain SKB1021 16S ribosomal RNA gene	۱۰۰

بحث

در بررسی مقاومت به شرایط اسیدی، شش جدایه از ۱۵ جدایه باکتریایی مقاومت خوبی در pH=۲/۵ داشتند. Sharifi و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی خاصیت پروبیوتیکی باکتری‌های جدا شده از ماست‌های محلی یزد، در pH های ۳ و ۲/۵، از مقاومت کمتر بیفیدوباکتریوم‌ها نسبت به لاکتوباسیلوس‌ها و همچنین، مقاومت بیشتر جدایه‌های لاکتوباسیلوس در شرایط اسیدی، نسبت به *استرپتوکوکوس* و *انتروکوکوس* گزارش کردند و به‌طور کلی، نتایج حاصل از تحقیقات آنها، حاکی از کاهش تعداد همه جدایه‌ها در pH=۲/۵ ، بعد از دو ساعت

بوده است. Akabandaو همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند، در شرایط pH =۲/۵ کاهش زنده‌مانی باکتری‌ها، بعد از دوساعت گرم‌خانه‌گذاری، نسبت به یک ساعت، چشمگیر است (۱۶). مطابق با نتایج مطالعه حاضر، اثر زمان بر کاهش مقاومت و کاهش زنده‌مانی جدایه‌ها نیز، موثر بوده است. درصد زنده‌مانی جدایه‌ها در pH =۲ ، نشان از کاهش زنده‌مانی جدایه‌ها بعد از ۱۲۰ دقیقه، نسبت به ۶۰ دقیقه است. علت آن، تجزیه شدن بیشتر دیوارۀ سلول باکتری توسط اسید، در مدت زمان بیشتر تماس، بوده است. Majidzadeh و همکاران (۲۰۱۱) اثر زمان و pH را در کاهش فعالیت جدایه‌ها بررسی کرده و نشان دادند، بعد از ۲ساعت گرم‌خانه‌گذاری، جدایه‌ها در pH =۲، ۵۵ الی ۶۰ ٪ کاهش زنده‌مانی داشتند که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (۱۷).

نتیجه حاصل شده در آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی، حاکی از حساسیت ۶۰٪ جدایه‌ها نسبت به به نمک‌های صفراوی است. طبق نتایج Sharifi و همکاران (۲۰۱۷) از ۲۴ جدایه لاکتوباسیلوس ماست‌های محلی استان یزد، در عصاره صفرای گاو ۰/۳٪ بعد از ۸ ساعت، ۱۰ جدایه مقاوم، دو جدایه بسیار مقاوم و ۱۲ جدایه غیر مقاوم شناسایی شد که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت (۶). Hajighasemi و همکاران (۲۰۱۶) نیز، بعد از طی ۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری باکتری‌ها در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۳٪، ۵ جدایه مقاوم و در مجاورت نمک صفراوی با غلظت ۰/۷٪، ۲ جدایه مقاوم را شناسایی کردند(۸).

جدایه‌های S8، S9 و S12 که مقاومت به pH=۲/۵ داشتند، ولی به pH =۲ حساس بودند، بعد از ۱۲۰ دقیقه مجاورت با شرایط شبیه‌سازی‌شده معده، کاملا از بین رفتند. همان‌طورکه انتظار می‌رفت، جدایه‌های مقاوم به pH=۲، به ترتیب، S7، S11 و S5 مقاوم‌ترین باکتری‌ها، به شرایط شبیه‌سازی‌شده معده، بعد از ۲ ساعت گرم‌خانه‌گذاری بودند، به‌طوری که به ترتیب، ۶۲٪، ۵۹٪ و ۴۰٪ زنده‌مانی نشان دادند. آنزیم پپسین در معده، به علت فعالیت پروتئولیتیک، بر دیوارۀ سلولی باکتری اثر گذاشته و منجر به نابودی باکتری می‌شود. در همین راستا، در مطالعه‌ای برای بررسی خواص پروبیوتیکی، مشخص شد که زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *رامنوسوس جی جی* در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده در حدود ۶۰ ٪ کاهش یافت درحالی‌که تحت اثر تیمار نمک کامل با آنزیم پپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار داشتند (۱۸).

در شرایط شبیه‌سازی‌شده روده، جدایه S6 کمترین مقاومت را نشان داد به‌طوری‌که این نتیجه قابل انتظار بود زیرا، زنده‌مانی این باکتری، در شرایط شبیه‌سازی‌شده معده، بعد از ۶۰ دقیقه، به صفر رسیده بود و در pH=۲/۵ نیز، مقاومت نشان نداد و همچنین، تحمل غلظت ۰/۳٪ نمک صفراوی را نیز، نداشت و حساس گزارش شده بود. در این ارتباط در پژوهشی بررسی زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس جی جی*، در شرایط شبیه‌سازی‌شده روده، نشان دادند که بیشترین کاهش زنده‌مانی بعد از ۳۰ دقیقه مجاورت با شرایط شبیه‌سازی‌شده روده، رخ داد، که علت آن به شوک ناگهانی ناشی از مجاورت باکتری با pH بالا و حضور نمک های صفراوی نسبت داده شد که حاکی از حساسیت بیشتر این باکتری، به شرایط شبیه‌سازی‌شده روده است(۱۹).

در بررسی اثرات ضد میکروبی نتایج نشان داد که بهترین گزینه برای مهار باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* جدایه‌های S9 و S4، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* جدایه‌هایS12 و S14، باکتری *اشرشیاکلی* جدایه‌های S3 و S8، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدایه‌هایS7 و S9 و در نهایت، مخمر *کاندیدا آلبیکنس* جدایه‌هایS3 و S14 بود. اثر ضد میکروبی برخی از جدایه‌های لاکتوباسیلوس ، تا حدی با کاهش pH توسط آن‌ها مرتبط است (۲۰)، اما، طبق نتایج به دست آمده، با توجه به مکانیسم‌های جدایه‌های لاکتوباسیلوس، در اعمال خاصیت ضدمیکروبی شاید نتوان همه خواص ضدمیکروبی را به کاهش pH مرتبط دانست بلکه ترشح باکتریوسین‌ها که ترکیبات ضد باکتریایی اغلب لاکتوباسیل‌ها است در این امر موثر است (۲۱). درباره این موضوع همچنان پژوهش‌ها و مطالعات زیادی در حال انجام است. نتایج Sharifi و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی جدایه‌های لاکتوباسیلوس از محصول لبنی سنتی تخمیری، حاکی از فعالیت ضد میکروبی قوی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، علیه باکتری‌های بیماری‌زای *سالمونلا تیفی موریوم*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیاکلی* بود(۶). در همین راستا در بررسی فعالیت ضدمیکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیلوس از دو نمونه ماست محلی، گزارش شد که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با میانگین مهارکنندگی قطر هاله، ۱۴/۶۸ میلی متر، در برابر *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، با میانگین مهارکنندگی قطر هاله، ۱۲/۳۷ میلی‌متر، در برابر *سودوموناس آئروژینوزا*، بیشترین فعالیت ضد میکروبی را داشتند. نتایج ذکر شده، با نتایج مطالعه حاضر نیز، مطابقت داشت.

یکی از جنبه های مهم قابل بررسی، در زمینه ایمنی استفاده از پروبیوتیک‌ها، مقاومت آنتی بیوتیکی است. این پتانسیل، خطر ناشی از انتقال ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی در میان لاکتوباسیل‌ها است. پس از عبور لاکتوباسیلوس‌ها، از مراحل اسیدی و صفرای دستگاه گوارش، در صورتی که واجد ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک مستقر بر پلاسمید

باشد، احتمال انتقال چنین ژن‌هایی، به ساکنین دائمی دستگاه گوارش و یا حتی سلول‌های پوششی (اپی‌تلیال) روده را داشته و لذا، ایمنی مصرف مداوم چنین باکتری‌هایی را به‌عنوان پروبیوتیک کاهش خواهد داد (۲۲).

در پژوهشی مقاومت جدایه‌های لاکتوباسیلوس جداشده، از پنیر محلی مازندران، در برابر آنتی‌بیوتیک‌های متداول بررسی شد و مشخص شد که اکثر جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، ونکومایسین و جنتامایسین، مقاوم بودند و در برابر آموکسی‌سیلین حساس و در برابر آنتی‌بیوتیک نیتروفورانتوئین نیز، نیمه حساس گزارش شدند (۲۳). این نتایج، با نتیجهٔ حاصل از پژوهش حاضر، مطابقت داشت.

Tsai و همکاران (۲۰۱۴) در مطالعه بالینی رت‌های آزمایشگاهی، به تاثیر باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس*، در کاهش کلسترول سرم خونی رت‌ها، پی برده و اظهار داشتند که، جدایه *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیس*، نیز، قادر به کاهش ۲۰٪ کلسترول تام سرم خونی رت‌ها، بودند (۱۴). Shehata و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی خواص سلامتی بخش جدایه‌های پروبیوتیکی بومی جدا شده از محصول لبنی سنتی تخمیری، برای آزمون کاهش کلسترول توسط جدایه‌های مورد نظر، در شرایط آزمایشگاهی، نشان دادند که، جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* قادر به کاهش کلسترول محیطی هستند (۱۳). هم‌زمان با فعالیت آنزیمی که برای هیدرولیز بیشتر نمک‌های صفراوی به‌وسیلهٔ جدایه‌ها صورت می‌گیرد، کاهش کلسترول و سم‌زدایی سیستم گوارشی به‌خصوص کبد نیز انجام می‌شود. مقایسهٔ توانایی هیدرولیز نمک‌های صفراوی نشان می‌دهد که، هرچه توانایی باکتری‌ها در هیدرولیز این نمک‌ها بیشتر باشد، کاهش کلسترول و سم‌زدایی سیستم گوارشی، به‌خصوص کبد، با قابلیت بهتری انجام می‌گیرد (۲۴). Mirlouhi و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعه بالینی موش‌های آزمایشگاهی، به تاثیر باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در کاهش کلسترول سرم خونی اشاره داشته و یکی از عوامل کاهش کلسترول به‌وسیلهٔ جدایه پروبیوتیکی را به دارا بودن آنزیم هیدرولیز کننده صفراوی، نسبت داده شده که سبب کاهش ۸ تا ۱۰ درصد کلسترول سرم خون می‌شود (۱۰). پژوهش Tsai و همکاران (۲۰۱۴) که استفاده از نمک‌های صفراوی تهیه‌شده از صفرای گاوی، در رژیم غذایی موش‌ها را بررسی کردند، نشان دادند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، بیشترین کاهش کلسترول سرمی را داشتند که مطابق با نتیجهٔ این تحقیق بوده (جدایه لاکتوباسیل فرمنتوم، S8) و علت کاهش کلسترول سرم خونی موش‌ها را، حضور آنزیم‌های هیدرولیزکننده صفراوی، توسط این جدایه‌های لاکتوباسیلوس دانستند (۱۴).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه نشان داده شد که کومه دارای پتانسیل زیادی برای جداسازی جدایه‌های پروبیوتیکی است و از این رو، جدایه‌های باکتریایی فعالی از نظر پروبیوتیکی دارد که در این تحقیق، جدایه‌هایی با خواص پروبیوتیکی از این محصول لبنی تخمیری سنتی نائین جداسازی گردید. جدایه‌های به‌دست آمده از این محصول قابلیت‌های متنوعی را برای ایجاد سلامتی دستگاه گوارش نظیر فعالیت ضد پاتوژن، ایجاد شرایط اسیدی و همچنین قابلیت تجزیه کلسترول که در ایجاد تندرستی مصرف‌کننده موثر است، دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی- واحد نور که امکانات آزمایشگاهی را برای انجام این مطالعه فراهم نمودند، سپاسگزار هستند. این مطالعه به‌عنوان طرح دانشجویی در مقطع دکتری تخصصی با شماره ۱۷۲۱ در تاریخ ۹۶/۱۰/۹ در دانشگاه آزاد اسلامی- واحد نور به تصویب رسیده است.

تعارض در منافع

در انجام این مطالعه، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافعی نداشته‌اند.

Referance

1. Bastani P, Akbarzadeh F, Homayouni A, Javadi M, Khalili L. Health Benefits of Probiotic Consumption. In: Garg N, Abdel-Aziz SM, Aeron A, editors. Microbes in Food and Health. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 163-83. [DOI:10.1007/978-3-319-25277-3_9] [PMID] [PMCID]
2. Handa S, Sharma N. In vitro study of probiotic properties of Lactobacillus plantarum F22 isolated from chhang-A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. J Genet Eng Biotechnol. 2016;14(1):91-7. [DOI:10.1016/j.jgeb.2016.08.001] [PMID] [PMCID]
3. Jadhav K, Sharma K, Katoch S, Sharma V, Mane B. Probiotics in broiler poultry feeds: A review. J Anim Nutr Physiol. 2015;1:04-16.
4. Barzegari A, Eslami S, Ghabeli E, Omidi Y. Imposition of encapsulated non-indigenous probiotics into intestine may disturb human core microbiome. Front Microbiol. 2014;5:393. [DOI:10.3389/fmicb.2014.00393] [PMID] [PMCID]

5. Anal AK, Singh H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends Food Sci Technol. 2007;18(5):240-51. [DOI:10.1016/j.tifs.2007.01.004]
6. Sharifi Yazdi MK, Davoodabadi A, Khesht Zarin HR, Tajabadi Ebrahimi M, Soltan Dallal MM. Characterisation and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. Ital J Anim Sci. 2017;16(2):185-8. [DOI:10.1080/1828051X.2016.1222888]
7. Famouri F, Shariat Z, Hashemipour M, Keikha M, Kelishadi R. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease in obese children and adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 2017;64(3):413-7. [DOI:10.1097/MPG.0000000000001422] [PMID]
8. Hajighasemi M, Mojgani N. Identification and Characterization of Probiotic Properties of Indigenous Lactic Acid Bacteria Based on Their Phenotypic and Genotypic Characteristics. Iran J Med Microbiol: Volume. 2016;9(4).
9. Halt J, Krieg N, Sneath P, Stely J, Williums S. Bergey's Manual of systemic Bacteriology. London; 1985.
10. Mirlouhi M, Soleymanianzad S, Sheykh zeyn aldin M. Identification of Lactobacilli from fecal flora of some Iranian infants. Iran J Pediatr. 2008;18(4):357-63.
11. de Valdez GF, Taranto MP. Probiotic Properties of Lactobacilli. Food Microbiology Protocols: Springer; 2001. p. 173-81.
12. Wong A, Ngu DYS, Dan LA, Ooi A, Lim RLH. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. Nutr J. 2015;14(1):95. [DOI:10.1186/s12937-015-0084-2] [PMID] [PMCID]
13. Shehata M, El Sohaimy S, El-Sahn MA, Youssef M. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. Ann Agric Sci. 2016;61(1):65-75. [DOI:10.1016/j.aoas.2016.03.001]
14. Tsai C-C, Lin P-P, Hsieh Y-M, Zhang Z-y, Wu H-C, Huang C-C. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism in vitro and in vivo. Sci World J. 2014;2014. [DOI:10.1155/2014/690752] [PMID] [PMCID]
15. Taheri HR, Moravej H, Tabandeh F, Zaghari M, Shivazad M. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. Poult Sci. 2009;88(8):1586-93. [DOI:10.3382/ps.2009-00041] [PMID]
16. Akabanda F, Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Glover RL, Nielsen DS, Jespersen L. Taxonomic and molecular characterization of lactic acid bacteria and yeasts in nunu, a Ghanaian fermented milk product. Food microbiol. 2013;34(2):277-83. [DOI:10.1016/j.fm.2012.09.025] [PMID]
17. Majidzadeh Heravi R, Kermanshahi H, Sankian M, Nassiri M, Moussavi AH, Nasiraii LR, et al. Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. African J Microbiol Res. 2011;5:1858-68. [DOI:10.5897/AJMR11.416]
18. Esmaeli F, Roozbeh Nasiraie L. Comparision of different treatments of simulated gastrointestinal conditions in probiotic bacterial Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus GG in order to achive the most realistic and practical model, : Islamic Azad University, Nour branch; 2014.
19. Boricha AA, Shekh S, Pithva SP, Padma S, Bharatkumar A, Vyas R. In vitro evaluation of probiotic properties of Lactobacillus species of food and human origin. LWT. 2019;106:201-8. [DOI:10.1016/j.lwt.2019.02.021]
20. Hu CH, Ren LQ, Zhou Y, Ye BC. Characterization of antimicrobial activity of three Lactobacillus plantarum strains isolated from Chinese traditional dairy food. Food Sci Nutr. 2019;7(6):1997-2005. [DOI:10.1002/fsn3.1025] [PMID] [PMCID]
21. Leite AM, Miguel M, Peixoto R, Ruas-Madiedo P, Paschoalin V, Mayo B, et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. J Dairy Sci. 2015;98(6):3622-32. [DOI:10.3168/jds.2014-9265] [PMID]
22. Kim YI, Poudel BK, Pradhan R, Choi H-G, Yong CS, Woo JS, et al. Development of a novel bi-coated combination capsule containing mosapride and probiotics for irritable bowel syndrome. Pharm Dev Technol. 2015;20(8):949-56. [DOI:10.3109/10837450.2014.954723] [PMID]
23. Tavakoli M, Hamidi-Esfahani Z, Hejazi MA, Azizi MH, Abbasi S. Characterization of probiotic abilities of Lactobacilli isolated from Iranian Koozeh traditional cheese. Pol J Food Nutr Sci. 2017;67(1):41-8. [DOI:10.1515/pjfns-2016-0003]
24. Rani RP, Anandharaj M, Ravindran AD. Characterization of bile salt hydrolase from Lactobacillus gasseri FR4 and demonstration of its substrate specificity and inhibitory mechanism using molecular docking analysis. Front Microbiol. 2017;8:1004. [DOI:10.3389/fmicb.2017.01004] [PMID] [PMCID]