Orginal Article | Iran J Med Microbiol. 2022; 16(1): 17-34

10.30699/ijmm.16.1.17
Iranian Journal of Medical Microbiology | ISSN:2345-4342

Isolation and Identification of *Lactobacillus brevis* from Local Cheese of Bazoft and Evaluation of Antimicrobial Activity Against Some Pathogenic Microorganisms

Iman Dehghani Champiri[1], Zahra Bamzadeh*[1,2], Ebrahim Rahimi[3], Leila Rouhi[4]

1. *Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*
2. *Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
3. *Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*
4. *Cellular and Developmental Research Center, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*

ABSTRACT

Background and Aim: Many local dairy products in Iran contain lactic acid bacteria. The aim of this study was to isolate and identify *Lactobacillus brevis* from the cottage cheese made in Bazoft city using biochemical and molecular methods and investigate its antimicrobial properties in vitro.

Materials and Methods: In this study, ten local Bazoft city cheese samples were collected. After transferring to the Lab, serial dilution was obtained at 10^{-6} CFU/mL and cultured in MRS medium. Then bacilli and gram-positive bacteria were isolated and identified by biochemical methods. The identified Lactobacillus brevis genome was extracted and then amplified using polymerase chain reaction (PCR) to confirm the isolated strain. Finally, the PCR product was sent to Sinaclon for sequencing. The antimicrobial properties of *Lactobacillus brevis* supernatant were evaluated using the disk and well diffusion method against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa,* and *Enterococcus faecalis*. Antibiotic susceptibility was also assessed by the CLSI standard method.

Results: Six species of *Lactobacillus* were identified from cottage cheese samples. Selected *L. brevis* showed good antimicrobial potency against five pathogenic bacteria. It showed the highest inhibitory effect against *S. typhimurium* during the well diffusion method with a mean diameter of growth inhibition zone of 19 mm and the least inhibitory effect against *E. faecalis* during the disc method with a growth inhibition zone diameter of 9 mm. It was also resistant to the antibiotics Vancomycin and Gentamicin, intermediate susceptible to Kanamycin and Nalidixic acid, and susceptible to Erythromycin, Tetracycline, Ampicillin, and Chloramphenicol.

Conclusion: Isolated *L. brevis* strain from the local Bazoft cheese has a good antimicrobial ability. By performing extra in vitro and in vivo tests, this native strain can be used more in medicines and the food industry.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, Pathogenic bacteria, Antibiotic resistance, Local cheese

Received: 2021/08/03; **Accepted**: 2021/12/15; **Published Online:** 2022/01/20

Corresponding Information: **Zahra Bamzadeh**, *1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran and 2. Department of Microbiology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
Email: Bamzadehz@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

Dehghani Champiri I, Bamzadeh Z, Rahimi E, Rouhi L. Isolation and Identification of *Lactobacillus brevis* from Local Cheese of Bazoft and Evaluation of Antimicrobial Activity Against Some Pathogenic Microorganisms. Iran J Med Microbiol. 2022; 16 (1) :17-34

Download citation: BibTeX | RIS | EndNote | Medlars | ProCite | Reference Manager | RefWorks |
Send citation to: Mendeley Zotero RefWorks

1. Introduction

Fermented dairy products are a good source for isolating microorganisms **(1, 2)**. Cottage cheeses made from raw milk have a high genetic diversity and a more complex microbial ecosystem than other dairy products **(3)**. Cheese traditionally produced from raw milk has a variety of genus, species, and native

microbial flora of the milk used in the preparation process (4). Cheese is produced due to the coagulation of casein by the renin enzyme or similar enzymes in the presence of lactic acid produced by microorganisms (5). Lactic acid bacteria that become part of the predominant microbial flora during the cottage cheese ripening (after one month) are often from the facultatively heterofermentative Lactobacilli (FHL) (6). Lactic acid bacteria are dietary supplements known for their fermentability and health and nutritional benefits. For this reason, they have beneficial effects on the host and help balance the microbial flora of the intestine, such as *Lactobacillus* (7).

Lactobacilli are a type of lactic acid bacteria considered safe bacteria. These bacteria are gram-positive, non-spores, catalase-negative, and are usually immobile (8). Lactobacilli have potent antagonistic activity against many microorganisms, including food spoilage organisms and pathogens. The production of secondary metabolites, lactic acid, and the resulting decrease in pH are the main factors in food preservation. In addition, some strains can help preserve fermented foods producing other inhibitors, such as bacteriocins (9). Lactobacilli produce various compounds such as Hydrogen peroxide and organic acids during lactic fermentation that can have inhibitory effects on many microorganisms (10). Due to increasing antibiotic resistance and side effects of chemical drugs, using alternative therapies is essential (11). These bacteria and their metabolites can be used therapeutically (12). Studies confirm the positive role of lactic acid bacteria in inhibiting pathogens (13, 14).

Due to its long-term use in various food products that are traditionally fermented, *Lactobacillus brevis*, as an essential member of the genus *Lactobacillus*, has a GRAS (generally recognized as safe) status that is isolated from milk, cheese, mouth, and gastrointestinal tract (15). The aim of this study was to isolate *L. brevis* from cottage cheese of Bazoft, Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran, and investigate its antibiotic resistance and antimicrobial ability of supernatant (culture supernatant) on pathogenic bacterial strains.

2. Materials and Methods

Sampling

In this study, 10 samples of cottage cheese were randomly collected from rural areas of Bazoft, Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran. The samples were transferred to the microbiology laboratory of Islamic Azad University Shahrekord Branch under cold conditions and kept at 4°C until the beginning of the experiment.

Sample Preparation and Initial Culture

Serial dilution of samples in sterile physiological solution was obtained at 10^{-6} (16). Then, for initial isolation, 1 ml of each cottage cheese sample was added to 9 mL of MRS broth (Merck, Germany) (de MAN, ROGOSA, and SHARPE). The samples were placed in an anaerobic jar for 24-48 hours at 37°C. Then, to obtain a single colony from the samples, the streak plate method was performed using a sterile inoculation needle on MRS agar and incubated for 37-48 hours at 37°C (17).

Morphological Study

First, Gram's method was performed for each colony, and then they were examined and recorded using an optical microscope at 100x magnification (18).

Biochemical Properties Investigation

Oxidase, catalase, motion, indole, endospore, and H2S tests were used to identify *Lactobacillus*. Also, the ability to grow at 15 and 45°C after 48 hours was evaluated (19, 20).

Carbohydrate's Fermentation

A Carbohydrate-free MRS medium was used for this purpose. Nine mL of MRS broth medium containing one percent of the desired carbohydrates (Arabinose, cellobiose, Melezitose, Melibiose, Raffinose, Ribose, and Sucrose) and phenol-red reagent were added to each test tube. Then one mL of the desired bacteria (10^7 CFU/mL) was inoculated into each tube and incubated for 48 hours at 37°C. Turning the red color of the environment to yellow means consuming the desired sugar. The results of carbohydrate fermentation were compared with the standard table of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology after the experiment (21).

Molecular Identification and Sequencing

Polymerase chain reaction (PCR) was used to identify and confirm the bacteria by molecular method. For this purpose, DNA was first extracted from the bacterial sample according to the protocol of the DNA extraction kit (Sinaclon, Iran). The extracted sample was used as a template for the PCR reaction. Sequence (5'-CTCAAAACTAAACAAAGTTTC-3') as forward primer and sequence (5'-CTTGTACACACC GCCCGTCA-3') as reverse primer were used (22). PCR reaction in 25 µL volume including 12.5 µL PCR buffer with 10 times density, 25 µM forward and reversed primer 0.5 µL each, 1 µL of 50 mM Magnesium chloride, 4 µL of 1.25 mM of dNTPs, 2.5 units of Taq DNA Polymerase enzyme, and 4 µL of extracted DNA, was performed. Reaction in a thermal cycler (FlexCycler2, Germany) with temperature conditions of 5 minutes, denaturation at 95°C and then 30 cycles including denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at 55°C for 1 minute, extension at 72°C for 1 minute and final extension at 72°C for 10 minutes was performed. The product was electrophoresed in 1% agarose gel and then examined on gel doc (AzmaCell, Iran). Finally, the PCR product was sent to Sinaclon, Iran, for sequencing.

Evaluation of Antimicrobial Properties of *Lactobacillus brevis*

Preparation of Supernatant

Purified *Lactobacillus brevis* was cultured on MRS broth and was incubated under anaerobic conditions at 37°C to obtain turbidity of 0.5 McFarland. Then, to prepare the supernatant, the selected culture of *Lactobacillus brevis* was centrifuged at 4000 rpm for 4 minutes, and then the supernatant was filtered using a 0.22-micron filter **(23)**.

Preparation of Pathogenic Bacteria

Five strains of pathogenic bacteria, including *Escherichia coli* (ATCC 2592), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), and *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), were obtained from Pasteur Institute of Iran and cultured in Nutrient broth. Then they were used with turbidity equivalent to 0.5 McFarland **(24)**.

Antimicrobial Activity

Mueller-Hinton agar (MHA) (Merck, Germany) medium was used to evaluate the antimicrobial activity of *L. brevis*. For this purpose, two agar well and disk diffusion methods were used. In both methods, the MRS Agar plate was a positive control for *L. brevis* growth **(25, 26)**.

Disk Diffusion Method

The 6 mm diameter paper disks (Padtan Teb, Iran) were soaked in *Lactobacillus brevis* supernatant for 5 minutes, then placed at 37°C to dry completely. Selected pathogenic bacteria cultured in Nutrient broth (*Liofilchem, Italy)* McFarland 0.5 were cultured on Mueller-Hinton agar plate using a swab. The disk impregnated with *L. brevis* supernatant was then placed on the surface of the Mueller-Hinton agar medium. After 24 hours of incubation at 37°C, the inhibitory zone diameter was measured **(25)**.

Agar Well Diffusion Method

During this method, the suspension of pathogenic bacteria in nutrient broth medium (0.5 McFarland) was cultured on Mueller-Hinton agar medium with a sterile swab. Then, wells were made on the medium using a sterile Pasteur pipette, and 30 µL of *L. brevis* supernatant was poured into the wells. After drying, the plates were incubated in a 37°C incubator for 24 hours. Then inhibition zone diameter created by *L. brevis* against each pathogenic bacterium was measured **(26)**.

Antibiotic Resistance

In this study, antibiotics Vancomycin (30 µg), Kanamycin (30 µg), Gentamicin (10 µg), Nalidixic acid (30 µg), Ampicillin (10 µg), Erythromycin (25 µg), Tetracycline (30 µg) (Padtan Teb, Iran) were used. To evaluate the resistance of *L. brevis* to the mentioned antibiotics, first, the desired strain with a density of 0.5 McFarland was cultured on MRS Agar medium. Then antibiotic discs with a specific density at a distance of 4 cm were placed on the plate surface. The plate was then incubated for 24 hours at 37°C. After this period, the inhibition zone diameter around the disc was measured, resistance and sensitivity to the antibiotic were evaluated. Also, MRS Agar medium was used to culture the positive control strain **(27, 28)**.

3. Results

A total of thirteen microorganisms were isolated, including gram-negative and gram-positive bacilli and cocci. Of these thirteen microorganisms, eight isolates were gram-positive bacilli. Six isolates tested negative for oxidase, catalase, indole, motility, and spore tests in this group and were considered as possible lactobacilli (Table 1).

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of bacteria isolated from cottage cheese

Isolate	Morphology	Gram	Oxidase	Catalase	Indole	Motility	Spore
PA1	Bacilli	positive	-	-	-	-	-
PA2	Bacilli	negative	+	+	-	+	-
PA3	Bacilli	positive	-	-	-	-	-
PA4	Cocci	positive	-	-	-	+	+
PA5	Bacilli	positive	+	+	-	-	+
PA6	Bacilli	positive	-	-	-	-	-
PA7	Cocci	positive	-	+	+	-	-
PA8	Bacilli	positive	+	+	-	-	-
PA9	Cocci	positive	+	-	-	+	-
PA10	Bacilli	positive	-	-	-	-	-

Isolate	Morphology	Gram	Oxidase	Catalase	Indole	Motility	Spore
PA11	Bacilli	negative	+	-	+	-	-
PA12	Bacilli	positive	-	-	-	-	-
PA13	Bacilli	positive	-	-	-	-	-

Sugar Consumption by Bacteria

Carbohydrate fermentation experiments, the results of bacterial sugar consumption, and the ability to grow at temperatures 15 and 45°C are expressed in Table 2.

Based on the results of biochemical tests (Tables 1 and 2), the PA6 isolate was selected as *L. brevis* according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Confirmation of Identification using PCR and Sequencing

To confirm the genus *Lactobacillus,* polymerase chain reaction (PCR) was used for the 16 s rRNA gene. The isolates were examined, and the formation of a 195 bp band by electrophoresis was confirmed by the biochemical diagnosis (Figure 1).

Table 2. Fermentation of carbohydrate test results

Isolate	Arabinose	Cellobiose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sucrose	Growth temperature 15/45
PA1	-	+	+	-	-	+	+	+/-
PA3	+	+	-	+	+	+	+	-/+
PA6	-	+	+	-	-	+	+	+/-
PA10	+	-	+	+	+	+	+	-/+
PA12	-	+	+	-	-	+	+	+/-
PA13	+	+	-	+	+	+	+	+/-

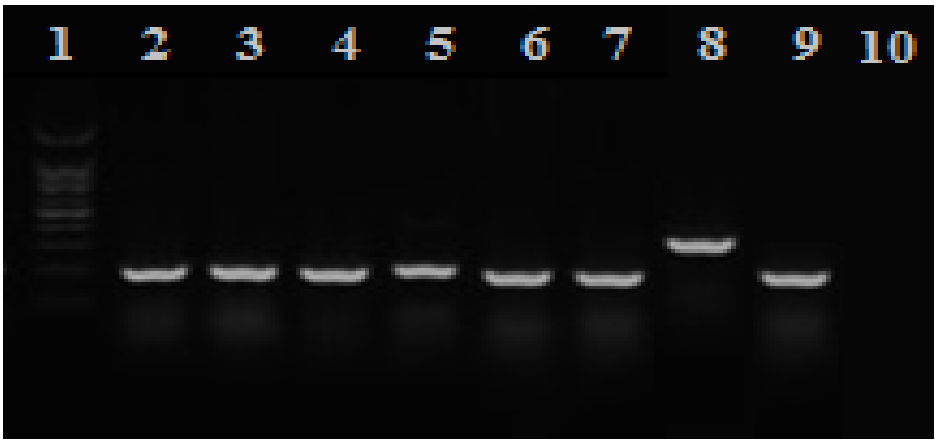


Figure 1. PCR test results. The six isolates had a band of 195 bp, which was confirmed as *Lactobacillus*. 1) 100bp Ladder 2-7) isolates with 195 bp band as *Lactobacillus* 8) non-*Lactobacillus* with 350 bp band 9) Positive Control (*Lactobacillus casei* PTCC 1608) 10) negative control

Sequencing

PCR product of isolate PA6 was sent to Sinaclon for sequencing. The results of PCR product sequencing after comparing the sequences with the data in NCBI and BLAST analysis of the obtained sequence showed the similarity of PA6 isolate with *L. brevis*, which showed the confirmation of biochemical results and correct species detection (Figure 2).

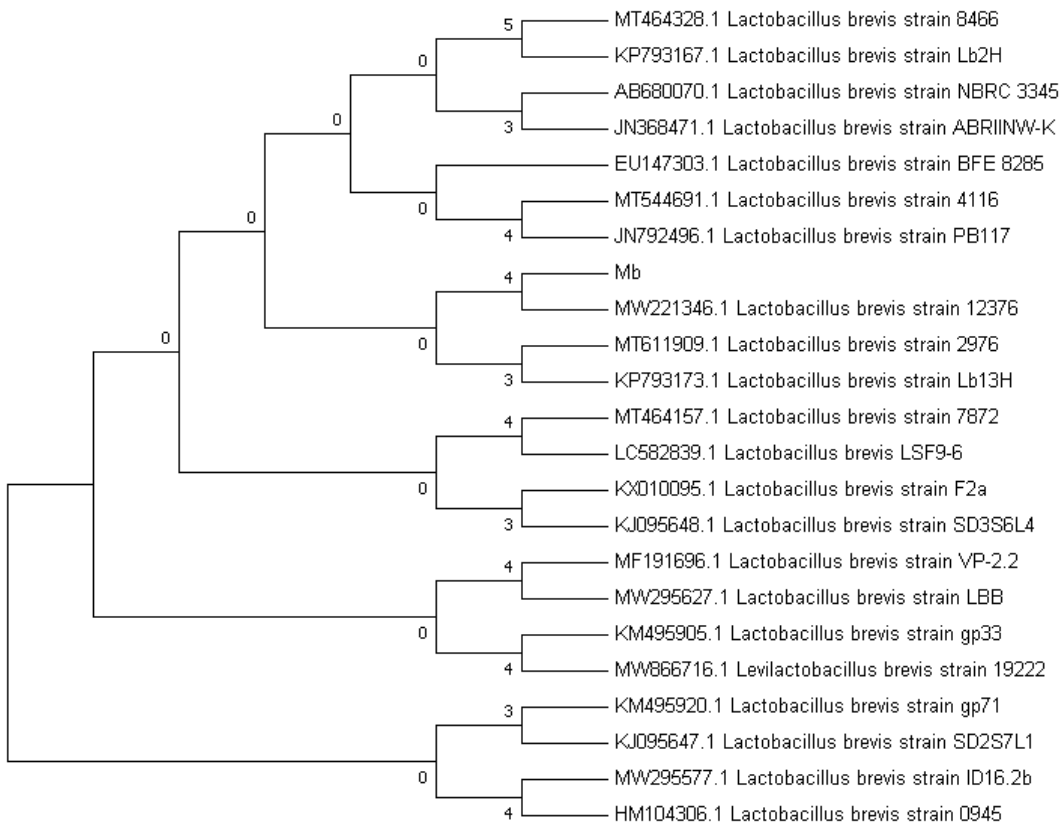


Figure 2. Phylogenetic tree of the selected *Lactobacillus brevis*

Antibiotic Resistance

The results of the antibiotic resistance test are demonstrated in Table 3. *L. brevis* was susceptible to Vancomycin and Gentamicin; this strain also was intermediate susceptible to Nalidixic acid and Kanamycin and was susceptible to Erythromycin and Kanamycin, Tetracycline, Ampicillin, and Chloramphenicol.

Table 3. Resistance of *Lactobacillus brevis* isolates against some common antibiotics

Strain	Erythromycin	Kanamycin	Tetracycline	Nalidixic acid	Gentamicin	Ampicillin	Chloramphenicol	Vancomycin
Lactobacillus brevis	S	I	S	I	R	S	S	R

Investigation of Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of *L. brevis* supernatant against five pathogenic strains was investigated by the disk and well diffusion methods (Figures 3 and 4). The results showed that the inhibitory ability varied from 9 to 19 mm. In both methods, the highest inhibitory effect was on the bacterium *Salmonella typhimurium,* a gram-negative bacterium and the cause of one of the most common food poisonings, and the least inhibitory effect was on *Enterococcus faecalis*, which is a gram-positive facultative anaerobic bacterium.

The results of the well diffusion method in (Figure 3) show the favorable inhibitory effect of *L. brevis*. During this method, the highest inhibitory effect was against *S. typhimurium* with inhibition of 19 mm, and the lowest inhibitory effect against *E. faecalis* with inhibition of 11 mm.

The results obtained in the disk diffusion method (Figure 4) show the inhibitory effect of *L. brevis*. During this method, the highest inhibitory effect was against *S. typhimurium* with inhibition of 16 mm, and the lowest inhibitory effect was against *E. faecalis* with inhibition of 9 mm.

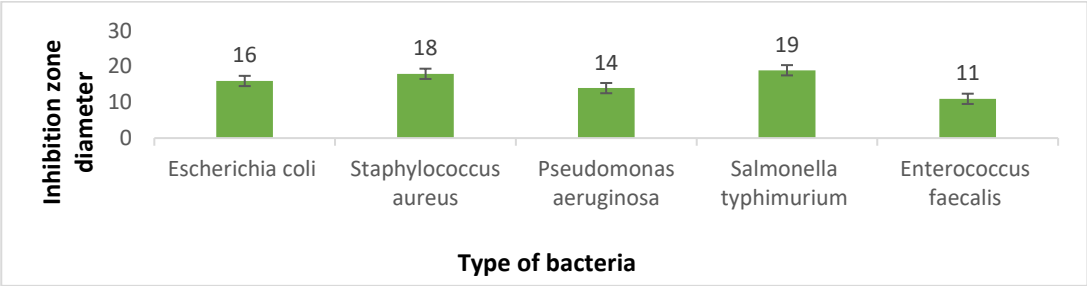


Figure 3. Inhibition zone diameter against pathogenic bacteria using well diffusion method

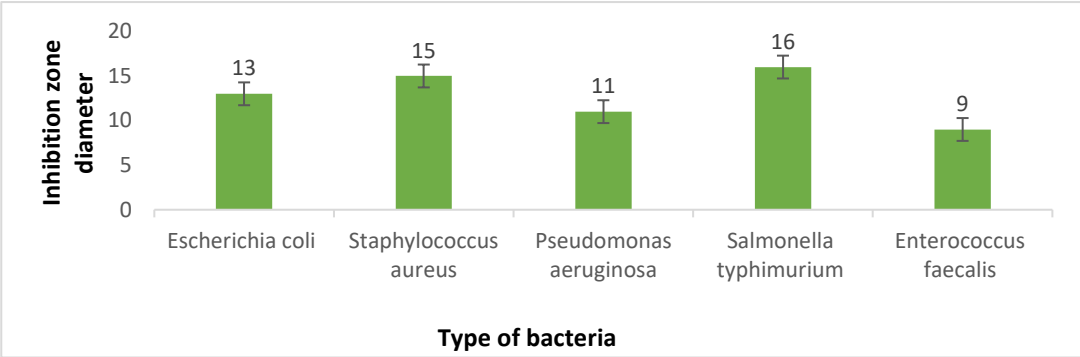


Figure 4. Inhibition zone diameter against pathogenic bacteria by disk diffusion method

4. Discussion

The diversity of *Lactobacillus* in food products and different geographical conditions is so great that this diversity in dairy products in the world is complex and widespread. For this reason, more research should be done to achieve suitable strains with specific functional characteristics **(29-31)**. Cheese is one of the dairy products widely available in hundreds of different types **(32)**. The cheese made in Bazoft is one of the types of cheese that has been little studied. Therefore, it is a good source for isolating microbial strains. MRS medium has been used to isolate lactobacilli in different sources. Identification of lactic acid bacteria is based on biochemical, morphological, and molecular properties **(33, 34)**.

The first part of this study was about the morphological and biochemical identification of *L. brevis* and its isolation from cottage cheese. Then, the molecular method was used to confirm biochemical tests **(22)**. According to our findings, the rod-shaped bacteria with diverse cell arrangements, gram-positive, catalase-negative, and non-spores, belong to the genus *Lactobacillus* from the lactic acid family. In this study, all isolates could not produce gas from glucose, so they were placed in the category of Facultatively Heterofermentative Lactobacilli. Isolates that grew at 15°C and could not grow at 45°C are also classified as mesophilic microorganisms **(19, 20)**. According to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, *L. brevis* can ferment the sugars Arabinose, Maltose, Ribose, Melibiose, and Sucrose but can also not ferment Mannose Melezitose **(21)**. Based on this, *L. brevis* was isolated from the cottage cheese and then confirmed by the molecular method. In this study, six bacteria out of 10 isolates from cottage cheese were identified as *Lactobacillus*, including two isolates of *Lactobacillus plantarum*, two isolates of *Lactobacillus casei*, one isolate of *Lactobacillus fermentum,* and one isolate of *L. brevis*.

In the study of Hejazi *et al*. in 2012, 8 out of 22 isolates were identified as *Lactobacillus*, which included five species of *Lactobacillus plantarum*, two species of *Lactobacillus brevis,* and one species of *Lactobacillus casei* **(35)**. In 2014, Singh and Singh isolated several Lactobacillus species, including *L. plantarum, Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, and *L. brevis*, from ripped cheddar cheese **(36)**.

In 2019, Abdali *et al*. identified 10 isolates from traditional Iranian cheese as *Lactobacillus*, of which six species were *L. plantarum* and the others were *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis,* and *Lactobacillus buchneri* **(37)**. In 2020, Zhang *et al*. isolated a total of 18 bacteria as Lactobacillus from cheese, including 5 isolates of *L. plantarum*, four isolates of *L. brevis*, two isolates of *Lactobacillus fermentum*, three isolates of *L. rhamnosus*, three isolates of *Lactobacillus furfuricola,* and one isolate of *L. paracasei* **(38)**.

The second part of this study was about the antimicrobial properties of *L. brevis*. Searching for safe, natural, and accessible antimicrobials has always been of interest to researchers. On the other hand, *Lactobacillus* bacteria are GRAS due to their antimicrobial properties and non-pathogenicity and can be an excellent alternative to use as antimicrobials **(39-41)**. Lactobacilli form a significant part of the natural intestinal flora of animals and humans **(42)**. They produce various antimicrobials such as Organic acids, Diacetyl, Acetone, Hydrogen peroxide, Retr-ocyclin, Antifungal peptides, and Bacteriocin. Inhib-ition of pathogenic activity by these bacteria can play an essential role in the health of individuals by combating infections caused by common pathogens of the gastrointestinal tract **(43)**. It also prevents the growth of spoilage and food poisoning microorg-anisms, increasing the durability and the safety of food products **(44)**. In this study, the well diffusion method had better and more positive results than the disk diffusion method, and *L. brevis* showed better inhibitory effects in the well diffusion method. *L. brevis* supernatant showed the highest inhibitory effect by well diffusion method against *Salmonella Typhimurium* with a growth inhibition zone of 19 mm and the least inhibitory effect by disk diffusion method with a growth inhibition zone of 9 mm against *E. faecalis*.

In a 2017 study by Azizi *et al*., the effect of antimicrobial compounds produced by *L. brevis* isolates against three bacteria, *S. aureus* (ATCC 25923), *Listeria innocua* (ATCC 33090), and *Escherichia coli* (ATCC 25922), was evaluated. The most susceptible and resistant bacteria to antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus* brevis were *S. aureus* and *Listeria innocua*, respectively **(45)**. Jabberi *et al*. in 2017 evaluated the antimicrobial activity of *L. brevis* isolated from cottage cheese made in pottery against *S. aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *S. typhimurium* (ATCC 19430), and *E. coli* (ATCC 25922) using well diffusion method. The results of their study showed that the largest and smallest growth inhibition zones were observed against *S. aureus* and *E. coli*, respectively **(46)**. In 2020, Hojjati *et al*. examined the antagonistic activities and safety properties of *L. brevis* isolated from traditional Iranian cheese. In this study, the antibacterial effect of *L. brevis* against pathogenic strains of *S. aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1707), *S. typhimurium* (PTCC 1609), and *E. coli* (ATCC 25922) was evaluated. The results showed that the most susceptible species were *S. aureus*, and the most resistant species was *S. typhimurium* **(47)**.

The third part of this study was about the susceptibility of *L. brevis* to common antibiotics. The mechanism of how antibiotics affect bacteria is different. The antibiotics Vancomycin and Ampicillin destroy the cell wall, Tetracycline and Chloramphenicol inhibit protein synthesis, and Penicillin affects cell permeability. In a 2011 report by Kirtzalidou *et al*., the strains of *L. brevis, L. plantarum*, and *Lactobacillus curvatus* were resistant to Vancomycin **(48)**. In a 2014 study by Shazali *et al*., *L. brevis* was resistant to Ciprofloxacin, Tetracycline, and Vancomycin **(49)**. A study by Falah *et al*. in 2019 showed that *L. brevis* is resistant to Vancomycin and Gentamicin and is susceptible to Ampicillin, Chloramphenicol, and Kanamycin **(50)**. Otaghsara *et al*. in 2020 reported that the *L. brevis* strain is resistant to Vancomycin and intermediate susceptible to the Tetracycline and Streptomycin antibiotics **(51)**. In this study, the resistance of *L. brevis* isolated from cottage cheese was distinct to different antibiotics. The results showed that *L. brevis* isolates were resistant to Vancomycin and Gentamicin, intermediate susceptible to Kanamycin and Nalidixic acid, and susceptible to Erythromycin, Ampicillin, Tetracycline, and Chloramphenicol.

5. Conclusion

Microorganisms' isolation from local sources is an effective way to obtain valuable strains with unique characteristics. In this study, *Lactobacillus brevis* isolated from the Bazoft cottage cheese had good antimicrobial properties against pathogenic bacteria. Also, antibiotic evaluation in *L. brevis* is necessary from a consumer safety perspective and can be considered to replace the lost microbial flora of the gastrointestinal tract during antibiotic therapy.

Acknowledgment

We would like to express our gratitude and thanks to all those who helped us during this research.

Funding

This article was done without organizational financial support.

Conflict of Interest

There is no conflict between the authors of the article.

Reference

1. Stanley G. Microbiology of fermented milk products. Int J Dairy Technol. 1998:50-79.
2. Belewu M, Aina O. Microbial evaluation of indigenous milk products with special reference to the bacterial flora of some public health importance. Afr J Microbiol. 2000;1(1):13-9.
3. Siso MG. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresour Technol. 1996;57(1):1-11. [DOI:10.1016/0960-8524(96)00036-3]

4. Garabal JI, Rodríguez-Alonso P, Centeno JA. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). LWT - Food Sci Technol. 2008;41(8):1452-8. [DOI:10.1016/j.lwt.2007.09.004]
5. Ahamdi S, Khamiri M, Khosroshahi A, Kashani Negad M. Isolation and identification of Lacic acid bacteria from Lighvan cheeses. J Agric Nat Resour. 2008;3(16):80-91.
6. Ghotbi M, Soleymaniyan Zad S, Sheikh Zeinoddin M. Identification of facultative hetrofermentive in Lighvan cheese. Iranian Food Science Technology. 6 (2): 145-148. Farci; 2010.
7. Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Rev. 1990;7(1-2):175-88. [DOI:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04887.x] [PMID]
8. De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr. 2000;71(2):405-11. [DOI:10.1093/ajcn/71.2.405] [PMID]
9. Vancanneyt M, Naser SM, Engelbeen K, De Wachter M, Van der Meulen R, Cleenwerck I, et al. Reclassification of Lactobacillus brevis strains LMG 11494 and LMG 11984 as Lactobacillus parabrevis sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56(7):1553-7. [DOI:10.1099/ijs.0.64215-0] [PMID]
10. Ilayaraja R. Antimicrobial activity and characterization of Lactobacillus reuteri isolated from human milk. Indian J Med Sci. 2010;3 (1/2):27-33.
11. Klaenhammer TR. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 1988;70(3):337-49. [DOI:10.1016/0300-9084(88)90206-4]
12. Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. J Antibiot (Tokyo). 2017;70(5):520-6. [DOI:10.1038/ja.2017.30] [PMID]
13. AFRC RF. Probiotics in man and animals. J Appl Microbiol. 1989;66(5):365-78. [DOI:10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x]
14. Arqués JL, Rodríguez E, Langa S, Landete JM, Medina M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. Biomed Res Int. 2015;2015. [DOI:10.1155/2015/584183] [PMID] [PMCID]
15. Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control. 2013;31(2):539-45. [DOI:10.1016/j.foodcont.2012.12.004]
16. Ehsani A, Mahmoudi R, Hashemi M, Raeisi M. Identification of Lactobacillus species isolated from traditional cheeses of west Azerbaijan. Iran J Med Microbiol 2014;8(1):38-43.
17. Rokhtabnak N, Khaleghi M, Sasan HA. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iran J Med Microbiol. 2016;10(1):24-34.
18. Nouri S, Nazeri S, Hosseyni P. Biochemical and molecular identification of probiotic bacteria. JCMR. 2018;31(1):106-13.
19. Bhardwaj A, Puniya M, Sangu K, Kumar S, Dhewa T. Isolation and biochemical characterization of Lactobacillus species isolated from Dahi. RRJoDST. 2012;1:18-31.
20. Zimina MI, Prosekov AJ, Babich OO, Sukhih SA. Identification and studying of the biochemical properties of lactobacillus strains. Life Sci. 2014;11(11):338-41.
21. Kandler O aWNGLJH, N.S. Nair, M.E. Sharpe Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8th ed ed1986.
22. Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiol Lett. 2002;214(2):271-5. [DOI:10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x] [PMID]
23. Mahdi LH, Husain SN. Antagonstic Effect of Lactobacillus Fermentum Supernatant AgainstEnterococcus Faeciumand Enterococcus Faecalis In Vitro. Journal of the Faculty of Medicine Baghdad. 2012;54(2):154-7.
24. Bibalan MH, Eshaghi M, Rohani M, Pourshafie MR, Talebi M. Determination of bacteriocin genes and antibacterial activity of lactobacillus strains isolated from fecal of healthy individuals. Int J Mol Cell Med. 2017;6(1):50.
25. Tajehmiri A, Darsanaki RK, Moslem MN, Lozoumi Z, Kolavani MH, Aliabadi MA. Antimicrobial Activity of Lactobacillus spp Isolated from Commercial Yoghurts against Pathogenic Bacteria. J Appl Microbiol. 2014;8:2211-5.
26. Shokraei SS, Rahimifard N, Shad MM. Comparison Of Three Methods For Evaluation Of The Antimicrobial Activity Of Lactobacillus Acidophilus Bacteria Againstescherichia Coli And Salmonella Enterica Serotype Enteritidis. Iran J Public Health. 2014;43(2):167.
27. Caglar E, Kargul B, Tanboga I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. Oral Dis.

2005;11(3):131-7. [DOI:10.1111/j.1601-0825.2005.01109.x] [PMID]

28. Jomehzadeh N, Javaherizadeh H, Amin M, Saki M, Al-Ouqaili MTS, Hamidi H, et al. Isolation and identification of potential probiotic Lactobacillus species from feces of infants in southwest Iran. Int J Infect Dis. 2020;96:524-30. [DOI:10.1016/j.ijid.2020.05.034] [PMID]

29. Hashemi SM, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Eshaghi Z. Potentially probiotic Lactobacillus strains from traditional Kurdish cheese. Probiotics Antimicrob Proteins. 2014;6(1):22-31. [DOI:10.1007/s12602-014-9155-5] [PMID]

30. Vinderola C, Reinheimer J. Culture media for the enumeration of Bifidobacterium bifidum and Lactobacillus acidophilus in the presence of yoghurt bacteria. Int Dairy J. 1999;9(8):497-505. [DOI:10.1016/S0958-6946(99)00120-X]

31. Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Le Lait. 2003;83(4):269-306. [DOI:10.1051/lait:2003019]

32. Campbell-Platt G. Fermented foods-a world perspective. Int Food Res J. 1994;27(3):253-7. [DOI:10.1016/0963-9969(94)90093-0]

33. De Man J, Rogosa d, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. J Appl Microbiol. 1960;23(1):130-5. [DOI:10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x]

34. Colombo M, de Oliveira AE, de Carvalho AF, Nero LA. Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of Lactobacillus casei in fermented milk. Food Microbiol. 2014;39:89-95. [DOI:10.1016/j.fm.2013.11.008] [PMID]

35. Hejazi m, mokhtari zp, khosroushahli m, barzegari a, lotfi h, eslami s, et al. Factors affecting the performance of an apple and kiwi-fruit electronic grading system. 2012.

36. Singh S, Singh R. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter Lactobacillus species diversity in Indian Cheddar cheese. LWT - Food Sci Technol. 2014;55(2):415-20. [DOI:10.1016/j.lwt.2013.09.018]

37. Abdali H, Saei-Dehkordi SS, Mobini-Dehkordi M, Abtahi-Froushani SM. First Isolation and Molecular Detection of Autochthonous Potential Probiotic Lactobacilli Isolates from Iranian Traditional Poosti Cheese and their Antioxidative Activity. BJM. 2020;8(32).

38. Zhang X, Esmail GA, Alzeer AF, Arasu MV, Vijayaraghavan P, Choi KC, et al. Probiotic characteristics of Lactobacillus strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens. Saudi J Biol Sci. 2020;27(12):3505-13. [PMID] [PMCID] [DOI:10.1016/j.sjbs.2020.10.022]

39. Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. The antimicrobial properties of different strains of Lactobacillus spp. isolated from kefir. Syst Appl Microbiol. 2003;26(3):434-7. [DOI:10.1078/072320203322497464] [PMID]

40. Carasi P, Diaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell Mde L. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated Lactobacillus kefiri. Biomed Res Int. 2014;2014:208974. [PMID] [PMCID] [DOI:10.1155/2014/208974]

41. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of Lactobacillus casei rhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol. 2001;152(2):167-73. [DOI:10.1016/S0923-2508(01)01188-3]

42. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in humans and animals. Microb Pathog. 2012;53(2):100-8. [DOI:10.1016/j.micpath.2012.05.007] [PMID]

43. Campana R, van Hemert S, Baffone W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. Gut Pathog. 2017;9(1):1-12. [DOI:10.1186/s13099-017-0162-4] [PMID] [PMCID]

44. Abriouel H, Pérez Montoro B, Casado Muñoz MdC, Knapp CW, Gálvez A, Benomar N. In silico genomic insights into aspects of food safety and defense mechanisms of a potentially probiotic Lactobacillus pentosus MP-10 isolated from brines of naturally fermented Aloreña green table olives. PLoS One. 2017;12(6):e0176801. [DOI:10.1371/journal.pone.0176801] [PMID] [PMCID]

45. Azizi F, Habibi Najafi MB, Edalatian Dovom MR. The biodiversity of Lactobacillus spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. AMB Express. 2017;7(1):176. [PMID] [PMCID] [DOI:10.1186/s13568-017-0474-2]

46. Jabbari V, Khiabani MS, Mokarram RR, Hassanzadeh AM, Ahmadi E, Gharenaghadeh S, et al. Lactobacillus plantarum as a probiotic potential from kouzeh cheese (traditional Iranian cheese) and its antimicrobial activity. Probiotics Antimicrob. 2017;9(2):189-93. [DOI:10.1007/s12602-017-9255-0] [PMID]

47. Hojjati M, Behabahani BA, Falah F. Aggregation, adherence, anti-adhesion and antagonistic activity properties relating to surface charge of probiotic Lactobacillus brevis gp104 against Staphylococcus aureus. Microb Pathog. 2020;147:104420. [DOI:10.1016/j.micpath.2020.104420] [PMID]

48. Kirtzalidou E, Pramateftaki P, Kotsou M, Kyriacou A. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. Anaerobe. 2011;17(6):440-3. [DOI:10.1016/j.anaerobe.2011.05.007] [PMID]

49. Shazali N, Foo HL, Loh TC, Choe DW, Abdul Rahim R. Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. Gut Pathog. 2014;6(1):1. [DOI:10.1186/1757-4749-6-1] [PMID] [PMCID]

50. Falah F, MORTAZAVI SA, TABATABAEI YF. Evaluation of probiotic properties of Lactobacillus brevis strain PML1 Based on the ability to adhesion to the epithelial cells of intestine. 2019.

51. Khanmohammadi Otaghsara O, Jamili S, Alipour M, Ghobadi S. Evaluation of probiotic properties and the antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from Rutilus kutum intestine. Iran J Fish Sci. 2020;19(6):3086-97.

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۶ ـ شماره ۱ ـ بهمن و اسفند ۱۴۰۰

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس برویس* از پنیرمحلی بازفت و ارزیابی فعالیت ضد میکروبی آن علیه برخی میکروارگانیسم‌های بیماریزا

ایمان دهقانی چم پیری[۱]، زهرا بم‌زاده[۱و۲*]، ابراهیم رحیمی[۲]، لیلا روحی[۳]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۴. مرکز تحقیقات سلولی و تکوینی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۱۲

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹

انتشار آنلاین: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

موضوع: میکروبیولوژی مواد غذایی

نویسندهٔ مسئول:

زهرا بم‌زاده، ۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران و ۲. گروه میکروبیولوژی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ایمیل:
Bamzadehz@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: در ایران فراورده‌های لبنی محلی زیادی وجود دارد که حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* از پنیر محلی شهرستان بازفت با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی و بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی آن در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش کار: در این مطالعه از ۱۰ نمونه پنیر محلی بازفت، چهارمحال بختیاری نمونه‌برداری انجام شد. پس از انتقال به آزمایشگاه رقت سازی تا 10^{-6} انجام و در محیط MRS کشت انجام شد. سپس باکتری‌های باسیلی شکل و گرم‌مثبت جداسازی شدند و به کمک روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. سپس به‌منظور تایید سویه جداسازی شده، استخراج ژنوم *لاکتوباسیلوس برویس* شناسایی شده انجام و تکثیر با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام گرفت. در نهایت محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت سیناکلون ارسال گردید. خاصیت ضد میکروبی مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس برویس* علیه عوامل بیماری‌زای *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروکوکوس فکالیس* به کمک روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش استاندارد CLSI ارزیابی شد.

یافته‌ها: از نمونه‌های پنیرمحلی شش گونه *لاکتوباسیلوس* شناسایی شد. *لاکتوباسیلوس برویس* منتخب توان ضد میکروبی مناسبی در مقابل پنج باکتری بیماری‌زا از خود نشان دادند، بیشترین اثر مهار کنندگی بر علیه *سالمونلا تیفی موریوم* طی روش چاهک با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵/۳ میلی‌متر و کمترین اثر مهارکنندگی بر علیه *انتروکوکوس فکالیس* در روش دیسک با قطر هاله عدم رشد ۸/۶ میلی‌متر از خود نشان داد. همچنین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و جنتامایسین مقاوم، نسبت به کانامایسین و نالیدیکسیک اسید نیمه حساس و نسبت به اریترومایسین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل حساس بود.

نتیجه‌گیری: سویه *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از پنیر محلی بازفت توانایی ضدمیکروبی مناسبی دارد و با انجام آزمون‌های in vitro و in vivo بیشتر می‌توان از این سویه بومی در داروها و مواد غذایی استفاده کرد.

کلید واژه‌ها: *لاکتوباسیلوس برویس*، باکتری‌های بیماری‌زا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، پنیر محلی

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

۱. مقدمه

فراورده‌های لبنی تخمیری منبع مناسبی برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها است (۱, ۲). پنیرهای محلی تهیه‌شده از شیر خام تنوع ژنتیکی بالایی داشته و در مقایسه با سایر فراورده‌های شیری اکوسیستم میکروبی پیچیده‌ای دارند (۳). پنیرهایی که به روش سنتی از شیر خام تولید می‌شوند دارای تنوع جنس ها، گونه‌ها و فلور میکروبی بومی شیرهایی است که در تهیه این نوع پنیرها به کار می‌روند (۴). علت به وجود آمدن پنیر، انعقاد کازئین به‌وسیلهٔ آنزیم رنین یا آنزیم‌های مشابه در حضور اسید لاکتیک تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها است (۵).

باکتری‌های اسید لاکتیک که در دوران رسیدگی پنیر محلی (بعد از یک ماه) جزو فلور میکروبی غالب آن می‌گردند غالباً از گروه

هتروفرمنتاتیو اختیاری [1](FHL) هستند (۶). باکتری‌های اسید لاکتیک مکمل‌های غذایی هستند که به دلیل قابلیت تخمیر و همچنین مزایای سلامتی و تغذیه‌ای شناخته شده‌اند؛ به همین دلیل روی میزبان تاثیرات سودمندی دارند و به تعادل فلور میکروبی روده کمک می‌کنند، از این باکتری‌ها می‌توان به لاکتوباسیلوس‌ها اشاره کرد (۷). لاکتوباسیلوس‌ها از انواع باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که به‌عنوان باکتری‌های ایمن در نظر گرفته می‌شوند این باکتری‌ها گرم مثبت، غیراسپورزا، کاتالاز منفی بوده و معمولا غیرمتحرک هستند (۸). لاکتوباسیل‌ها فعالیت آنتاگونیستی قوی علیه بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله ارگانیسم‌های فاسد کننده مواد غذایی و عوامل بیماری‌زا دارند. تولید متابولیت‌های اولیه، اسید لاکتیک و کاهش pH ناشی از آن عوامل اصلی حفظ مواد غذایی می‌باشند. علاوه بر این، برخی از سویه‌ها با تولید سایر مواد بازدارنده مانند باکتریوسین‌ها می‌توانند به حفظ غذاهای تخمیرشده کمک کنند (۹). لاکتوباسیلوس‌ها ترکیبات مختلفی مانند پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی را در طول تخمیرهای لاکتیک تولید می‌کنند که قادرند اثرات بازدارندگی روی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها داشته باشند (۱۰). با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و عوارض استفاده از داروهای شیمیایی، استفاده از درمان‌های جایگزین بسیار ضروری است (۱۱). این دسته از باکتری‌ها و متابولیت‌های تولیدی آنها می‌توانند کاربرد درمانی داشته باشند (۱۲). پژوهش‌های انجام‌شده تائید کننده نقش مثبت باکتری‌های اسید لاکتبک در مهار عوامل بیماری‌زا است (۱۳, ۱۴).

لاکتوباسیلوس برویس به‌عنوان یکی از اعضای مهم جنس لاکتوباسیلوس به دلیل استفاده طولانی مدت از آن در محصولات مختلف غذایی که به‌طور سنتی تخمیر می‌شوند، دارای وضعیت GRAS[2] است که از شیر، پنیر، دهان و دستگاه گوارش جدا شده است (۱۵). هدف از این مطالعه، جداسازی *لاکتوباسیلوس برویس* از پنیر محلی بازفت، چهارمحال بختیاری و بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی ضد میکروبی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) آن روی سویه‌های بیماری‌زای باکتریایی است.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در این مطالعه ۱۰ نمونه پنیر محلی به‌طور تصادفی از مناطق روستایی، بازفت استان چهارمحال و بختیاری جمع‌آوری شد. نمونه‌ها تحت شرایط سرد به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد شهرکرد منتقل گردید و تا شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

آماده سازی نمونه‌ها وکشت اولیه

سری رقت تا 10^{-6} از نمونه در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد (۱۶). سپس برای جداسازی اولیه، ابتدا یک میلی‌لیتر از هر نمونه پنیر محلی، به ۹ میلی‌لیتر محیط MRS براث (مرک، آلمان) (de MAN, ROGOSA and SHARPE) اضافه شد. نمونه‌ها در جار بی‌هوازی به مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. سپس برای گرفتن کلنی تک از نمونه‌ها به‌وسیلهٔ آنس استریل روی محیط MRS آگار کشت خطی داده شد و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند (۱۷).

بررسی ریخت‌شناسی

برای هر کلنی ابتدا رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. سپس به‌وسیلهٔ میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی X ۱۰۰ بررسی و ثبت شد (۱۸).

بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی

برای شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها از تست‌های اکسیداز، تست کاتالاز، تست حرکت، تست اندول، تست اندوسپور، تست H_2S استفاده شد همچنین توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس پس از ۴۸ ساعت ارزیابی شد (۱۹, ۲۰).

تخمیر کربوهیدرات‌ها

به این منظور از محیط MRS بدون کربوهیدرات استفاده شد. به هر لوله آزمایش، نه میلی‌لیتر محیط MRS براث حاوی یک درصد از کربوهیدرات‌های مورد نظر (آرابینوز، مالتوز، مانوز، ملی زیتوز، ریبوز، ملیبیوز و ساکارز) و معرف فنل رد اضافه شد. سپس یک میلی‌لیتر از باکتری مورد نظر (10^{7} CFU/mL) به هر لوله تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. تبدیل رنگ قرمز محیط به رنگ زرد به معنی مصرف قند مورد نظر است. پس از انجام آزمایش نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها با جدول استاندارد برجی مقایسه شد (۲۱).

شناسایی مولکولی و توالی‌یابی

برای شناسایی و تایید باکتری به روش مولکولی از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) استفاده شد. برای این منظور ابتدا

[1]. Facultative Heterofermentative Lactobacilli (FHL)

[2]. Generally recognized as safe

استخراج DNA از نمونه باکتری مطابق با پروتکل کیت استخراج DNA (سیناکلون، ایران) انجام شد. از نمونه استخراج شده به‌عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد. از توالی آغازگر واکنش PCR با استفاده از پرایمر رفت (5'-CTCAAAACTAA-ACAAAGTTTC-3') و پرایمر برگشت (5'-CTTGT-ACACACC GCCCGTCA-3') استفاده شد (۲۲). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، پرایمر رفت و برگشت با غلظت ۲۵ میکرومولار هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر کلراید منیزیم ۵۰ میلی مولار، چهار میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱/۲۵ میلی مولار و ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymeraseو مقدار ۴ میکرولیتر DNA استخراج شده، انجام گرفت. واکنش در دستگاه ترموسایکلر(FlexCycler2، ساخت آلمان) با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه ، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و سپس در دستگاه ژل داک (آزماسل، ایران) بررسی شد. در نهایت محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت سیناکلون، ایران ارسال گردید.

ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس برویس*

تهیه سوپرناتانت

لاکتوباسیلوس برویس خالص شده در محیط MRSبراث، در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند به‌دست آید سپس برای تهیه سوپرناتانت کشت باکتری منتخب *لاکتوباسیلوس برویس* به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰۰ سانتریفوژ شد و مایع رویی با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی، فیلتر شد (۲۳).

آماده‌سازی باکتری‌های بیماری‌زا

پنج سویه باکتری بیماری‌زا شامل *اشریشیا کلی* (۲۵۹۲ ATCC)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC ۱۴۰۲۸)، *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC ۲۷۸۵۳) و *انتروکوکوس فکالیس* (ATCC ۲۹۲۱۲) از شرکت زیست رویش تهیه و پس کشت در محیط نوترینت براث با کدورتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند مورد استفاده قرار گرفتند (۲۴).

فعالیت ضد میکروبی

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* از محیط مولرهینتون آگار (MHA) (مرک، آلمان) استفاده شد. به این منظور از دو روش چاهک و دیسک استفاده گردید. در هر دو روش از پلیت MRS Agar برای رشد *لاکتوباسیلوس برویس* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۲۵, ۲۶).

روش دیسک

دیسک‌های کاغذی (پاتن طب، ایران) به قطر ۶ میلی‌متر در مایع رویی (سوپرناتانت) *لاکتوباسیلوس برویس* به مدت ۵ دقیقه آغشته شدند سپس در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا کاملا خشک شوند. باکتری‌های بیماری‌زای منتخب کشت داده شده در محیط نوترینت براث (لیوفیلکم، ایتالیا) ۰/۵ مک‌فارلند روی سطح پلیت محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) با سواپ کشت داده شدند. سپس دیسک آغشته شده به محلول رویی *لاکتوباسیلوس برویس* روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ناحیه مهاری اندازه‌گیری شد (۲۵).

روش چاهک

طی این روش از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زای کشت داده شده در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد سپس به کمک پیپت پاستور استریل چاهک‌هایی روی محیط ایجاد کرده و از مایع رویی کشت (سوپرناتانت) باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* به میزان ۳۰ میکرو لیتر در چاهک‌ها ریخته شد، بعد از خشک شدن محیط، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده به‌وسیلهٔ باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* علیه هر یک از باکتری های بیماری‌زا اندازه‌گیری شد (۲۶).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

در این مطالعه از آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین(۳۰µg)، کانامایسین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، اریترومایسین (۲۵µg)، تتراسایکلین (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۱۰µg)، (پاتن طب، ایران) استفاده شد. به‌منظور بررسی مقاومت باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده، ابتدا سویه مورد نظر با غلظت نیم مک‌فارلند در پلیت‌های حاوی محیطMRS Agar کشت داده

و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با غلظت مشخص را در فاصله ۴ سانتی‌متری روی سطح پلیت قرار داده سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از این مدت قطر هاله اطراف دیسک را اندازه‌گیری کرده، مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک بررسی شد همچنین محیط MRS Agar برای رشد سویه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد (mm) اندازه‌گیری گردید و نتایج به صورت سویه مقاوم (≤ ۱۵ mm)، نیمه حساس(۱۶-۲۰ mm) و حساس (≥ ۲۱ mm) گزارش شد (۲۷, ۲۸).

۳. یافته‌ها

در مجموع سیزده میکروارگانیسم جداسازی شد که شامل باسیل و کوکوسی‌های گرم منفی و گرم مثبت بودند. در این سیزده میکروارگانیسم هشت جدایه باسیل گرم مثبت بود، در این گروه شش جدایه پاسخ به تست‌های اکسیداز، کاتالاز، ایندول، حرکت و تست اسپور منفی بود و به‌عنوان لاکتوباسیل احتمالی درنظر گرفته شد (جدول ۱).

مصرف قند به‌وسیلهٔ باکتری‌ها

آزمایش تخمیر کربوهیدرات، نتایج استفاده باکتری‌ها از قندها و همچنین توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۵ درجه در جدول ۲ نشان داده شده است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی (جدول ۱و۲) مطابق با طبقه‌بندی کتاب برجی جدایه PA6 به‌عنوان *لاکتوباسیلوس برویس* انتخاب شد.

تایید شناسایی با استفاده از PCR و توالی‌یابی

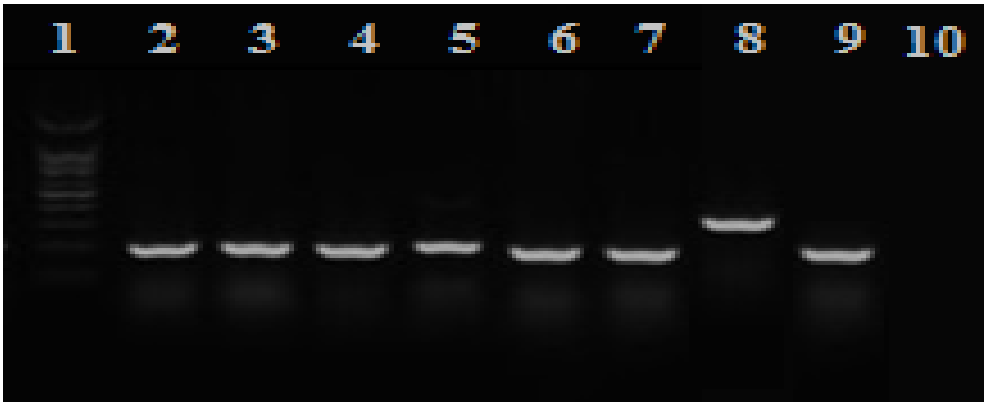
برای تایید جنس *لاکتوباسیلوس* از طریق واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای ژن 16s rRNA جدایه‌ها بررسی شدند که تشکیل باند ۱۹۵ جفت بازی در الکتروفورز نشان‌دهندهٔ تایید تشخیص بیوشیمیایی بود (شکل ۱) .

جدول ۱. ویژگی‌های ریخت شناسی و بیوشیمیایی باکتری‌های جدا شده از پنیرمحلی

جدایه	شکل	گرم	اکسیداز	کاتالاز	ایندول	حرکت	اسپور
PA1	باسیل	مثبت	-	-	-	-	-
PA2	باسیل	منفی	+	+	-	+	-
PA3	باسیل	مثبت	-	-	-	-	-
PA4	کوکسی	مثبت	-	-	-	+	+
PA5	باسیل	مثبت	+	+	-	-	+
PA6	باسیل	مثبت	-	-	-	-	-
PA7	کوکسی	مثبت	-	+	+	-	-
PA8	باسیل	مثبت	+	+	-	-	-
PA9	کوکسی	مثبت	+	-	-	+	-
PA10	باسیل	مثبت	-	-	-	-	-
PA11	باسیل	منفی	+	-	+	-	-
PA12	باسیل	مثبت	-	-	-	-	-
PA13	باسیل	مثبت	-	-	-	-	-

جدول ۲. نتایج مربوط به آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها

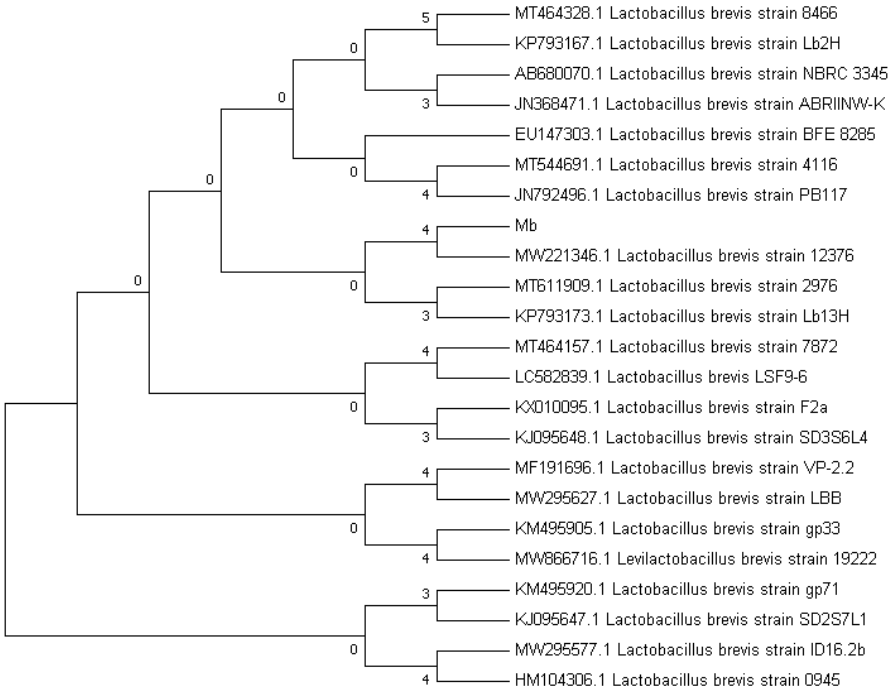
جدایه	آرابینوز	مالتوز	مانوز	ملی زیتوز	ریبوز	ملیبیوز	ساکارز	دمای رشد ۱۵/۴۵
PA1	+	+	-	-	+	-	-	+/-
PA3	-	+	+	+	-	+	+	-/+
PA6	+	+	-	-	+	+	+	+/-
PA10	+	+	+	+	+	+	+	-/+
PA12	+	+	-	-	+	+	+	+/-
PA13	-	+	-	+	+	-	+	+/-



شکل۱. نتایج آزمون PCR. ۶ جدایه دارای باند ۱۹۵ جفت بازی بودند که به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* تایید شدند. ۱) لدر bp ۱۰۰ ۲) نمونه‌های ۲تا ۷ جدایه‌های با باند ۱۹۵ جفت باز به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* ۳) شماره ۸ غیر از *لاکتوباسیلوس* با باند ۳۵۰ جفت باز ۴) شماره ۹ کنترل مثبت (Lactobacillus casei PTCC 1608) ۵) شماره ۱۰ کنترل منفی

توالی‌یابی

ارسال محصول PCR جدایه PA6 برای توالی‌یابی به شرکت سیناکولون انجام شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی محصول PCR پس از مقایسه توالی‌ها با داده‌های موجود در NCBI و تجزیه و تحلیل BLAST توالی به‌دست‌آمده شباهت جدایه PA6 با *لاکتوباسیلوس برویس* را نشان داد که نشان بر تایید نتایج بیوشیمیایی و تشخیص صحیح گونه بود (شکل ۲).



شکل۲. درخت فیلوژنتیکی *لاکتوباسیلوس برویس* منتخب

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

نتایج مربوط به تست مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جدول۳ نشان داده شده است. سویه *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر ونکومایسین و جنتامایسین مقاوم بود، همچنین این سویه در برابر کانامایسین، نالیدیکسیک اسید حساسیت نسبی داشت و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل حساس بود.

جدول ۳. مقاومت جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج

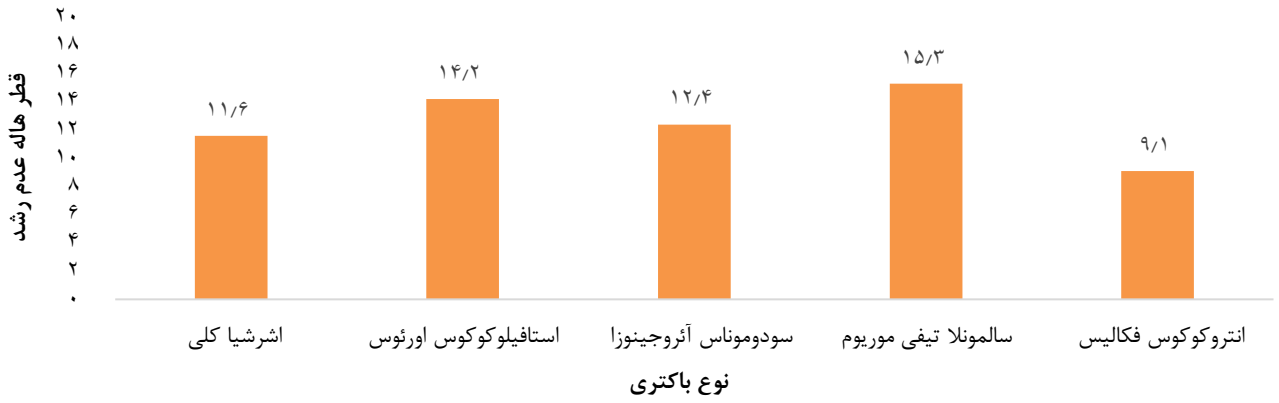
سویه	اریترومایسین	کانامایسین	تتراسایکلین	نالیدیکسیک اسید	جنتامایسین	آمپی سیلین	کلرامفنیکل	ونکومایسین
لاکتوباسیلوس برویس	حساس	حساسیت نسبی	حساس	حساسیت نسبی	مقاوم	حساس	حساس	مقاوم

بررسی فعالیت ضد میکروبی

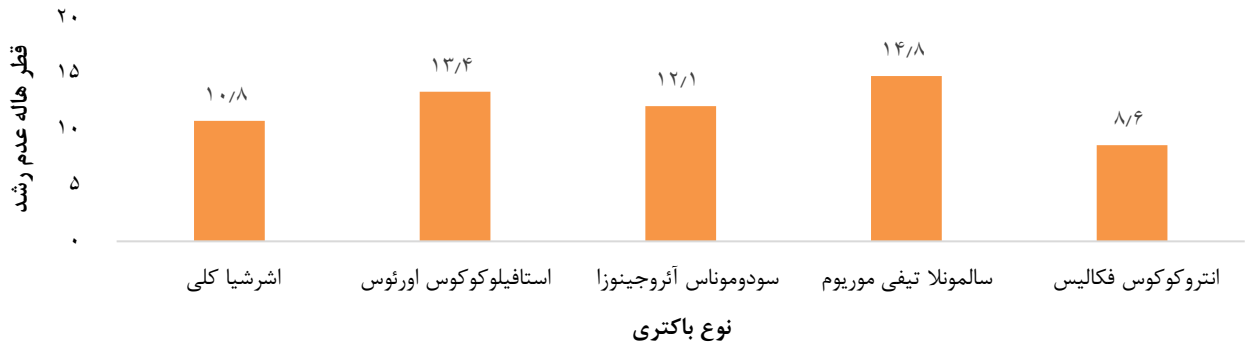
فعالیت ضد میکروبی مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس برویس* علیه پنج سویه بیماری‌زا به کمک دو روش دیسک و چاهک بررسی شد (شکل‌های ۳ و۴). نتایج نشان داد توانایی مهارکنندگی از ۱۶-۸ میلی‌متر متغیر بود. در هر دو روش بیشترین اثر بازدارندگی روی باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* بوده که باکتری گرم منفی است و عامل یکی از شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی است و کمترین اثر بازدارندگی روی *انتروکوکوس فکالیس* بوده که باکتری گرم‌مثبت بی‌هوازی اختیاری است.

نتایج روش چاهک در (شکل۳)، نشان‌دهندهٔ اثر مهاری مطلوب *لاکتوباسیلوس برویس* است. طی این روش بیشترین اثر مهاری علیه پاتوژن *سالمونلا تیفی موریوم* با مهار ۱۵/۳ میلی‌متر و کمترین میزان مهارکنندگی علیه *انتروکوکوس فکالیس* با مهار ۹/۱ میلی‌متر بود.

نتایج به‌دست‌آمده در روش دیسک در (شکل ۴)، نشان‌دهندهٔ اثر مهاری *لاکتوباسیلوس برویس* است. طی این روش، بیشترین اثر مهاری را علیه *سالمونلا تفی موریوم* با مهار ۱۴/۸ و کمترین میزان مهارکنندگی نیز علیه *انتروکوکوس فکالیس* با مهار ۸/۶ میلی‌متر بود.



شکل۳. قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری‌های پاتوژن به روش چاهک



شکل۴. قطر هاله عدم رشد در برابر باکتری‌های پاتوژن به روش انتشار دیسک

۴.بحث

تنوع *لاکتوباسیلوس‌ها* در محصولات غذایی و در شرایط جغرافیایی متفاوت زیاد است، آنچنان که این تنوع در محصولات لبنی در دنیا نیز بسیار پیچیده و گسترده است. به همین دلیل برای دستیابی به سویه‌های مناسب با خصوصیات عملکردی خاص باید تحقیقات بیشتری صورت گیرد (۲۹-۳۱). پنیر یکی از گونه‌های لبنیات است که به‌طور گسترده‌ای در صدها نوع مختلف وجود دارد (۳۲). پنیر محلی بازفت یکی از انواع پنیرها است که تحقیقاتی کمی در مورد آن صورت گرفته است. به همین دلیل منبع مناسبی برای جداسازی سویه‌های میکروبی از این محصول است. در منابع مختلف برای جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از محیط کشت MRS استفاده شده است. شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و مولکولی انجام می‌گردد (۳۳, ۳۴).

بخش اول این پژوهش در مورد شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی *لاکتوباسیلوس برویس* و جداسازی این جدایه از پنیر محلی بود. سپس، برای تأیید تست‌های بیوشیمیایی، از روش مولکولی استفاده شد (۲۲). مشخص گردید که، باکتری‌های که میله‌ای شکل با آرایش سلولی متنوع، گرم مثبت، کاتالاز منفی و غیراسپورزا به جنس *لاکتوباسیلوس* از خانواده اسید لاکتیک‌ها تعلق دارند. در این مطالعه تمامی جدایه‌ها فاقد توانایی تولید گاز از گلوکز بودند، بنابراین در دسته لاکتوباسیلوس‌های هتروفرمنتاتیو اختیاری قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های که در دمای ۱۵ درجه سلسیوس رشد کردند و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، قادر به رشد نبودند در دسته میکروارگانیسم‌های مزوفیل قرار می‌گیرند (۱۹, ۲۰). بر اساس اطلاعات کتاب برجی لاکتوباسیلوس برویس قادر به تخمیر قندهای آرابینوز، مالتوز، ریبوز، ملیبیوز، ساکاروز است و همچنین قادر به تخمیر قندهای مانوز و ملی زیتوز نیست (۲۱). بر این اساس جداسازی *لاکتوباسیلوس برویس* از پنیر محلی انجام و سپس به‌وسیلهٔ روش مولکولی تایید شد در این مطالعه از ۱۰ جدایه از پنیر محلی بازفت ۶ باکتری به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی شد که شامل دو جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، دو جدایه *لاکتوباسیلوس کازئی*، یک جدایه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و یک جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* بود.

در مطالعه Hejazi و همکاران، در سال ۲۰۱۲ از ۲۲ ایزوله جداسازی شده، ۸ ایزوله را به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی نمودند که شامل پنج گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، دو گونه *لاکتوباسیلوس برویس* و یک گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* بود (۳۵). Singh و Singh درسال ۲۰۱۴ چندین *لاکتوباسیلوس* از جمله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنسوس*، *لاکتوباسیلوس کارواتوس* و همچنین گونه *لاکتوباسیلوس برویس* را از پنیر چدار رسیده جدا کردند (۳۶).

Abdali و همکاران در سال ۲۰۱۹ از پنیر سنتی پوستی ایران ۱۰ ایزوله به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی کردند که شش گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و سایر آنها *لاکتوباسلوس پاراکازیی*، *لاکتوباسلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسلوس برویس* و *لاکتوباسلوس بوخنری* بودند (۳۷). Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مجموع از پنیر ۱۸ باکتری به‌عنوان *لاکتوباسیلوس* جداسازی کردند که شامل ۵ جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، چهار جدایه *لاکتوباسلوس برویس*، دو جدایه *لاکتوباسلوس فرمنتوم*، سه جدایه *لاکتوباسلوس رامنسوس*، سه جدایه *لاکتوباسیلوس فورفوریکولا* و یک جدایه *لاکتوباسیلوس پارا کازئی* بود (۳۸).

بخش دوم این پژوهش در مورد خاصیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* بود. جستجو برای به‌دست آوردن مواد ضد میکروبی که بی‌خطر، طبیعی و در دسترس باشد همیشه مد نظر محققین بوده است. از طرفی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* به دلیل خاصیت ضد میکربی و همچنین عدم بیماری‌زایی، به‌عنوان ارگانیسم‌های بی‌خطر (GRAS) شناخته شده‌اند و می‌توانند جایگزین خوبی برای استفاده به‌عنوان مواد ضد میکروبی باشد (۴۱-۳۹). *لاکتوباسیلوس‌ها* بخش عمده‌ای از فلور طبیعی روده حیوانات و انسان‌ها را تشکیل می‌دهند (۴۲). مواد ضد میکروبی متفاوتی از جمله اسیدهای آلی، دی‌استیل، استون، پراکسید هیدروژن، روتروسایکلین، پپتیدهای ضد قارچی و باکتریوسین تولید می‌کنند (۱۱). ممانعت از فعالیت عوامل بیماری‌زا به‌وسیلهٔ این باکتری‌ها می‌تواند نقش مهمی در سلامت افراد به واسطه مقابله با عفونت‌های ناشی از پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش باشد (۴۳). همچنین باعث ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های فاسد و مسموم‌کننده مواد غذایی شده که به نوبه خود سبب افزایش ماندگاری و افزایش ایمنی محصولات غذایی می‌گردند (۴۴). در این مطالعه روش چاهک نسبت به روش دیسک از نتایج بهتر و مثبت‌تری برخوردار بود و *لاکتوباسیلوس برویس* اثرات مهارکنندگی بهتری در روش چاهک از خود نشان دادند جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر پنج سویه شاخص بیماری‌زا

عملکرد بالایی را از خود نشان داد مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس برویس* بیشترین اثر بازدارندگی را با روش چاهک علیه *سالمونلا تیفی موریوم* با هالهٔ عدم رشد ۱۸/۳ و کمترین اثر بازدارندگی را با روش دیسک با هاله عدم رشد ۱۱/۸ علیه *انتروکوکوس فکالیس* از خود نشان داد.

در مطالعه Azizi و همکاران در سال ۲۰۱۷ تأثیر ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر سه باکتری شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *لیستریا اینوکوآ* (ATCC 33090) و *اشریشیا کلی*(ATCC 25922) مورد سنجش قرار گرفت. حساس‌ترین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین باکتری *لیستریا اینوکوآ* در برابر ترکیبات ضد میکروبی تولید شده به‌وسیلهٔ جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* از پنیر موتال بودند (۴۵). Jabbari و همکاران در سال ۲۰۱۷ به ارزیابی فعالیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از پنیر کوزه در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 25923)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (ATCC 12228)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC (19430) و *اشریشیاکلی* (ATCC 25922) با استفاده از روش انتشار چاهک پرداختند. نتایج مطالعه آنها نشان داد بزرگترین و کوچکترین هالهٔ مهار رشد به ترتیب در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی* مشاهده شد (۴۶). Hojjati و همکاران در سال ۲۰۲۰ فعالیت‌های آنتاگونیستی و خواص ایمنی *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از پنیر سنتی ایرانی را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه اثر ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس برویس* علیه سویه‌های بیماری‌زا *استافیلوکوکوس اورئوس*(ATCC 25923)، *سودوموناس ائروجنوزا* (PTCC 1707)، *سالمونلا تیفی‌موریوم* (PTCC 1609) و *اشریشیاکلی* (ATCC 25922) ارزیابی شد. نتایج نشان داد حساس‌ترین گونه *استافیلوکوکوس اورئوس* و مقاوم‌ترین گونه *سالمونلا تیفی‌موریوم* است (۴۷).

بخش سوم این پژوهش در مورد حساسیت *لاکتوباسیلوس برویس* علیه آنتی‌بیوتیک‌های رایج بود. مکانیسم اثر آنتی‌بیوتیک بر باکتری‌ها از طرق مختلف است. آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و آمپی‌سیلین دیوارهٔ سلولی را از بین می‌برد، تتراسایکلین و کلروامفنیکل از سنتز پروتین جلوگیری می‌کند و پنیسیلین نفوذپذیری سلول را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در گزارش Kirtzalidou و همکاران در سال ۲۰۱۱ سویه‌های لاکتوباسیلوس برویس، *لاکتوباسیلوس پلانتروم*، *لاکتوباسیلوس کارواتوس* نسبت به ونکومایسین مقاوم بود (۴۸). در مطالعهٔ Shazali و همکاران در سال ۲۰۱۴ سویه *لاکتوباسیلوس برویس* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین، تتراسایکلین و ونکومایسین مقاوم بود (۴۹). مطالعه Falah و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان داد که لاکتوباسیلوس برویس به ونکومایسین و جنتامایسین مقاوم است و نسبت به آمپی‌سیلین، کلرامفنیکل و کانامایسین حساس است (۵۰). Khanmohammadi Otaghsara و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند سویه *لاکتوباسیلوس برویس* به آنتی‌بیوتیک ونکومایسین مقاوم است و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین و استرپتومایسین نیمه حساس است (۵۱). در این مطالعه مقاومت سویه *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از پنیر محلی بـه آنتی‌بیوتیـک‌های مختلف متفاوت بود. نتایج نشـان داد کـه جدایهٔ *لاکتوباسیلوس برویس* نسبت به ونکومایسین و جنتامایسین مقاوم، نسبت کانامایسین، نالدیکسیک اسید به حساسیت نسبی و نسبت به اریترومایسین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل، حساس بود.

۵. نتیجه‌گیری

جداسازی میکروارگانیسم‌ها از منابع محلی، روشی مؤثر برای به‌دست آوردن سویه‌های مفید با ویژگی‌های منحصر به‌فرد است. در این مطالعه *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از پنیر محلی بازفت دارای خاصیت ضد میکروبی مناسـبی در بـرابـر باکتری‌های بیماری‌زا مورد مطالعه بود. همچنین ارزیابی آنتی‌بیوتیکی در باکتری *لاکتو باسیلوس برویس* از دیدگاه ایمنی مصرف‌کننده امری ضروری است و می‌توان برای جایگزین نمودن فلور میکروبی ازدست‌رفته دستگاه گوارش طی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی بسیار مورد توجه قرار گیرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدردانی و تشکر خود را از تمام کسانی که در طول انجام این پژوهش ما را یاری کردند اعلام می‌داریم.

تعارض در منافع

بین نویسندگان مقاله تعارضی وجود ندارد.

منابع مالی

این مقاله بدون حمایت مالی سازمانی انجام شده است.