

Isolation and Identification of *Lactobacillus salivarius* from Buffalo Milk and Evaluation of Its Antimicrobial Activity

Elham Hossein Alipour¹, Karim Mardani², Mehran Moradi²

1. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Science, Payam Noor University, East of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Article Information

Article history:

Received: 2017/05/28
Accepted: 2018/04/29
Available online: 2018/06/30

Article Subject:

Food Microbiology

IJMM 2018; 12(2): 96-106

Corresponding author:

Mehran Moradi
Assistant Professor in Food
Hygiene, Department of Food
Hygiene and Quality Control,
Faculty of Veterinary
Medicine, Urmia University,
Urmia, Iran

Tel: 044-31942633

Email:

m.moradi@urmia.ac.ir

Use your device to scan
and read the article online



Abstract

Background and Aims: *Lactobacillus salivarius* is a well-known probiotic bacterium, which is commonly isolated from gastro-intestinal tract of human and animals. The objectives of the present study were isolation, molecular detection and antimicrobial characterization of *L. salivarius* from buffalo's raw milk.

Materials and Methods: A total number of 20 buffalo milk samples were collected aseptically from traditional buffalo farms in Urmia city, Iran. Milk samples were cultured and incubated on MRS agar, then suspected colonies were primarily determined according to their appearance and biochemical characteristics. Bacteria species were confirmed by polymerase chain reaction accompanied by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and nucleotide sequencing of 16s rRNA gene. Antimicrobial activity of *L. salivarius* against pathogenic bacteria including *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* was examined using agar-spot and agar-disk diffusion methods. Cell surface hydrophobicity of *L. salivarius* was also investigated according to microbial adhesion to xylene and toluene hydrocarbons.

Results: From 60 suspected colonies which were selected according to phenotypic characteristics, 23 colonies were confirmed as lactic acid bacteria based on the molecular identification. Only one isolate belonged to *L. salivarius*. The antimicrobial activity results showed a significant growth inhibitory effect of *L. salivarius* on pathogenic bacteria comparing to standard bacteria. *L. salivarius* had the most inhibitory effect on *S. aureus* while it had the least inhibitory against *S. typhimurium*. The hydrophobicity of *L. salivarius* to xylene and toluene were 55.3% and 55.6% respectively.

Conclusions: Based on the results, the frequency of the *Lactobacillus* genus *s* was very low in buffalo milk. In addition, isolated *L. salivarius* had strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria.

Keywords: Buffaloes, *Lactobacillus salivarius*, Antimicrobial Capacity, Hydrophobicity, Molecular Diagnostics, Milk.

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Hossein Alipour E, Mardani K, Moradi M. Isolation and Identification of *Lactobacillus salivarius* from Buffalo Milk and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (2): 96-106



جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس سالیواریوس از شیر گاومیش و ارزیابی اثرات ضد میکروبی آن

الهام حسین علیپور^۱، کریم مردانی^۲، مهران مرادی^۲

۱. گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، تهران، ایران

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: لاکتوباسیلوس سالیواریوس، باکتری پروبیوتیک شناخته شده‌ای است که از دستگاه گوارش انسان و حیوانات جدا می‌شود. هدف از این مطالعه، جداسازی لاکتوباسیلوس سالیواریوس از شیر خام گاومیش و شناسایی مولکولی و بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی آن در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش کار: تعداد ۲۰ نمونه شیر خام گاومیش از دامداری‌های سنتی و صنعتی شهرستان ارومیه تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه، روی محیط MRS کشت داده شدند. در ادامه کلنی‌های مشکوک از نظر شکل و خصوصیات بیوشیمیایی انتخاب و به منظور تعیین گونه آنها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و به دنبال آن چندشکلی طولی قطعه محدودشونده (PCR-RFLP) و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* استفاده شد. اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس سالیواریوس و مایع رویی آن بر علیه لیستریا منوسیتوزنز، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب به روش نقطه‌ای و دیسک بررسی شد. همچنین هیدروفوبیسیته سطحی باکتری به روش اتصال باکتری به هیدروکربن‌گزیلن و تولن ارزیابی شد.

یافته‌ها: از ۶۰ جدایه مشکوک به دست آمده از شیر گاومیش، پس از تعیین توالی نوکلئوتیدی، تعداد ۲۳ جدایه مختلف از باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شد که فقط یک جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس بود. جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس اثر مهارتی معنی‌داری در مقایسه با باکتری استاندارد، بر عوامل بیماری‌زای مطالعه شده داشت. بیشترین و کمترین اثر مهارتی به ترتیب در استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی‌موریوم مشاهده شد. هیدروفوبیستی باکتری نسبت به گزیلن ۵۵/۳ درصد و تولن ۵۵/۶ درصد گزارش شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع جنس لاکتوباسیلوس در شیر گاومیش بسیار پایین است و لاکتوباسیلوس سالیواریوس جدا شده از خصوصیات ضد میکروبی منحصر به فردی در مقایسه با باکتری پروبیوتیک استاندارد برخوردار است.

کلمات کلیدی: گاومیش، لاکتوباسیلوس سالیواریوس، قدرت ضد میکروب، هیدروفوبیستی، تشخیص مولکولی، شیر

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۰۷

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۰۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۴/۰۹

موضوع:

میکروب شناسی مواد غذایی

IJMM1397;12(2): 96-106

نویسنده مسئول:

مهران مرادی

استادیار، گروه بهداشت و کنترل کیفی

مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه

ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۲۶۲۳

پست الکترونیک:

m.moradi@urmia.ac.ir



مقدمه

اگزوپلی ساکارید را نیز دارند. ترکیبی که در مقاومت میکروارگانیسم در مقابل فاژها، حملات انگل‌ها و نیز تشکیل بیوفیلم اهمیت بسزایی داشته و موجب افزایش مقاومت باکتری می‌شود. تولید اسید لاکتیک از سوی این باکتری‌ها و در نتیجه کاهش pH محیط از جمله عواملی است که منجر به عملکرد ضد میکروبی آنها می‌شود. همچنین تولید ترکیبات ضد میکروبی متنوع که در دو دسته ترکیبات با وزن مولکولی پایین (پراکسید هیدروژن، دی‌اکسید کربن و دی‌استیل) و وزن مولکولی بالا (نظیر باکتریوسین‌ها) قرار می‌گیرند، از ویژگی‌های بارز این باکتری‌ها

باکتری‌های اسید لاکتیک، فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات به شمار می‌روند. در بسیاری از اکوسیستم‌های غذایی این باکتری‌ها بخش اعظمی از میکروفلور غالب را تشکیل می‌دهند و ممکن است به صورت کشت کمکی و یا استارتر به محصولات غذایی نیز اضافه شوند. همچنین باکتری‌های اسید لاکتیک علیه عوامل مختلف بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا، طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی را تولید می‌کنند و لذا این قابلیت را دارند که برای مقابله با این نوع از عوامل میکروبی استفاده شوند (۱، ۲). در شرایط خاصی، بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک توانایی تولید

برخوردار است (۱۳). تاکنون از منابع مختلف برای جداسازی، شناسایی و عرضه جدایه‌های جدید با خصوصیات عملکردی مناسب استفاده شده که نتیجه آن دستیابی به سویه‌های جدید و استفاده از آنها در صنایع مختلف بوده است. با این وجود، محققان همچنان درصدد جداسازی و شناسایی جدایه‌های جدید با خصوصیات عملکردی منحصربه‌فرد هستند. تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک در محصولات غذایی مختلف و در شرایط جغرافیایی مختلف متفاوت است. این تنوع در محصولات لبنی تولید و عرضه‌شده در دنیا از جمله شیر گاو میش که تولید و مصرف آن محدوده جغرافیایی خاصی را در بر می‌گیرد نیز بسیار پیچیده و متنوع است و می‌تواند انگیزه‌ای برای غربال‌گری این محصولات با هدف دستیابی به سویه‌های مناسب با خصوصیات عملکردی و تکنولوژیک ویژه باشد. با وجود انجام مطالعاتی درباره ویژگی‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات لبنی شیر گاو میش (۱۵، ۱۴، ۶) مطالعه جامعی در زمینه تنوع، گونه‌های غالب و حضور باکتری لاکتوباسیلوس سالیواریوس در شیر گاو میش صورت نپذیرفته است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی فنوتیپی و مولکولی لاکتوباسیلوس سالیواریوس از شیر خام گاو میش و ارزیابی برخی اثرات پروبیوتیکی آن از جمله اثرات ضد میکروبی و باکتریوسینوژنیک بر علیه سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیژنوز و استافیلوکوکوس اورئوس و هیدروفوبیسیستی سطحی باکتری در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری شیر خام گاو میش و شناسایی فنوتیپی

جدایه‌های لاکتوباسیلوس

تعداد ۲۰ نمونه شیر خام گاو میش از دامدارهای سنتی و صنعتی شهرستان ارومیه در ۶ ماه اول سال ۱۳۹۴ جمع‌آوری شد و سریعاً در داخل بطری‌های استریل در شرایط سرد به آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. برای جداسازی اولیه، ابتدا یک میلی‌لیتر از هر نمونه شیر، به ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS برات (deMan, Rogosa and Sharpe) (شرکت کیولب، کانادا) اضافه شد و هر نمونه در شرایط بی‌هوازی در جار و با استفاده از گاز پک نوع C در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت انکوبه شد. سپس از هر نوع نمونه با آنس روی محیط MRS آگار کشت خطی داده و پلیت‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن حداکثر تعداد ۵ کلنی تکی متفاوت به صورت تصادفی از هر نمونه

است. از سال‌ها پیش رابطه بین باکتری‌های اسیدلاکتیک و سلامت انسان مشخص شده است. خصوصیات سلامتی بی‌شمار باکتری‌های اسیدلاکتیک باعث شده است که این دسته به‌عنوان کاندیدای مناسبی برای میکروارگانیزم پروبیوتیک مطرح شوند (۴،۳).

لاکتوباسیلوس‌ها، باکتری‌های گرم مثبت میله‌ای شکل متعلق به باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند. این جنس بیشترین تنوع بین‌گونه‌ای را دارند و بالغ بر ۱۵۲ گونه مختلف هستند. این باکتری‌ها در موادی با میزان کربوهیدرات بالا زیست می‌کنند و از مخاط دهان، روده و واژن انسان و حیوانات تا گیاهان و محصولات غذایی مختلف جداسازی و شناسایی شده‌اند. لاکتوباسیلوس‌ها نقش مهمی در تولید محصولات تخمیری سبزی، گوشت و محصولات لبنی دارند (۵). در محصولات لبنی و دیگر محصولات تخمیری، لاکتوباسیلوس‌ها مسئول برخی ویژگی‌ها از جمله تولید اسیدلاکتیک، کاهش میزان لاکتوز، بهبود خصوصیات حسی، فیژیکی و شیمیایی و کنترل عوامل بیماری‌زا هستند. لذا از گونه‌های مختلف این جنس به‌عنوان استارتر و یا پروبیوتیک استفاده می‌شود و تلاش‌های زیادی برای جداسازی گونه‌های جدید این باکتری در حال انجام است (۶).

لاکتوباسیلوس سالیواریوس همچون بسیاری از گونه‌های لاکتوباسیلوس، به دلیل خصوصیات ویژه، به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک مطرح است. از ویژگی‌های پروبیوتیک این باکتری می‌توان به ایجاد تعادل میکروبی در روده، تولید ترکیبات ضد میکروب، تحریک سیستم ایمنی، مهار فعالیت آنزیمی مدفوع، تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر اشاره کرد. این باکتری به دلیل تولید باکتریوسین‌های زیر کلاس IIa, IIb, IIc به‌عنوان یک پروبیوتیک شاخص مطرح است (۷). تاکنون مطالعات مختلفی برای جداسازی لاکتوباسیلوس سالیواریوس از منابع مختلف از جمله مدفوع نوزاد شیرخوار (۸، ۹) گوشت عمل‌آوری‌شده خوک (۱۰) و مدفوع مرغ (۱۱، ۱۲) انجام شده است که نتیجه این تحقیقات جداسازی سویه‌های مختلف با ویژگی‌های عملکردی متفاوت است. در برخی نمونه‌ها از جمله لاکتوباسیلوس سالیواریوس CECT جداسازی شده از مدفوع نوزاد شیرخوار (۸)، باکتری به‌عنوان پروبیوتیک شناخته شده در سطح دنیا بهره‌برداری می‌شود.

تلاش به‌منظور جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک با خصوصیات منحصربه‌فرد از شیر و محصولات تخمیری برای استفاده در غذاهای عملگرا (Functional food) از اهمیت ویژه‌ای

کنترل استفاده شدند. این باکتری‌ها از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شدند. برای نگهداری باکتری‌ها در دمای 18°C - و تهیه سوسپانسیون آنها از محیط کشت لوریا برتانی و MRS استفاده شد. برای به دست آوردن تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر، از روش تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر و کشت باکتری استفاده شد.

بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس سالیواریوس

ویژگی‌های ضد میکروبی لاکتوباسیلوس سالیواریوس به روش نقطه‌ای و کشت دولایه انجام گرفت (۱۹). برای این منظور مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱۸ ساعته جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس روی MRS آگار ریخته شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C نگهداری شدند. سپس ۷ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی نیمه جامد حاوی تعداد استاندارد ($10^6 \times 1/5$) باکتری در هر میلی‌لیتر) از هر یک از باکتری‌های بیماری‌زای بررسی شده (لیستریا مونوسیژنوز، سالمونلاتیفی موریوم، اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس) در فاز ایستایی به صورت لایه دوم به پلیت اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، ناحیه مهاری تشکیل شده بررسی و با کولیس اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5 به عنوان نمونه شاهد برای مقایسه با لاکتوباسیلوس سالیواریوس استفاده شد.

بررسی تولید باکتریوسین لاکتوباسیلوس سالیواریوس

پس از تأیید خواص ضد میکروبی جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس، برای تهیه مایع رویی حاصل از کشت باکتری (Cell free supernatant)، در محیط MRS برای باکتری کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 35°C در انکوباتور شیکردار از آن نگهداری به عمل آمد. سپس سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای 2°C با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای از بین بردن اثر اسیدلاکتیک و پراکسید هیدروژن احتمالی تولید شده از سوی باکتری، به ترتیب pH مایع رویی به دست آمده از کشت باکتری با استفاده از سود ۰/۱ نرمال در عدد ۷ تنظیم شد و در ادامه آنزیم کاتالاز (دو میلی‌گرم در لیتر) به آن اضافه شد (۲۰). پس از انجام تیمار، مایع رویی با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی، فیلتر و خصوصیت تولید باکتریوسین بررسی شد. بدین منظور، دیسک‌های کاغذی به قطر ۶ میلی‌متر در مایع رویی به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و پس از خشک شدن در دمای 37°C ، روی سطح پلیت کشت داده شده با باکتری‌های بیماری‌زای منتخب قرار گرفتند. پس از

انتخاب شد و ابتدا تست کاتالاز و سپس رنگ‌آمیزی گرم و بررسی شکل با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام پذیرفت (۱۶). کلنی‌هایی که به شکل گرد و محدب با لبه یک‌دست، رنگ سفید اپک و موکوئید، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند، برای انجام آزمایشات مولکولی انتخاب شدند.

شناسایی مولکولی

برای شناسایی جدایه‌های لاکتوباسیلوس به روش مولکولی، ابتدا DNA ژنومی از جدایه‌های انتخاب شده با استفاده از روش توصیف شده از سوی Aljanabi و Martinez (۱۹۹۷) استخراج شد (۱۷). قطعه‌ای از ژن *16S rRNA* به اندازه ۱۵۴۰ جفت باز با استفاده از جفت پرایمر توصیف شده از سوی Scarpellini و همکاران (۲۰۰۲) شامل پرایمر رفت (EGE1) و برگشت (EGE2) به ترتیب با توالی‌های 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 3'-CTACGGCTACCTTGTACGA-5' و واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱۰ برابر، پرایمر رفت و برگشت با غلظت ۲۵ میکرومولار هر کدام ۰/۵ میکرولیتر، یک میکرولیتر کلراید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، چهار میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱/۲۵ میلی‌مولار، ۲/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و مقدار ۵ میکرولیتر DNA استخراج شده، انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر QB96 (Quanta Biotech, UK) با برنامه دمایی عرضه شده از سوی Scarpellini و همکاران انجام گرفت (۱۸). در ادامه قطعه تکثیر شده با استفاده از آنزیم *HinfI* هضم آنزیمی شد و به منظور شناسایی گونه، الگوی هضم آنزیمی محصول PCR جدایه‌های مختلف با الگوی هضم آنزیمی جدایه‌های گزارش شده در بانک ژن مقایسه شد. همچنین برای تأیید نتایج هضم آنزیمی از هر جدایه با الگوی متفاوت هضمی، یک نمونه محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت سینا کلون ارسال شد. لازم به ذکر است که نتایج تعیین توالی بیان نشده است.

ارزبایی ویژگی‌های ضد میکروبی لاکتوباسیلوس

سالیواریوس

تهیه و آماده‌سازی باکتری‌ها

در این مطالعه، باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم ATCC 1730، اشریشیا کلی ATCC 11303، لیستریا مونوسیژنوز ATCC 19115، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 به عنوان عوامل بیماری‌زا و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5 به عنوان

یافته‌ها

شناسایی مولکولی باکتری‌های اسیدلاکتیک

از تعداد ۶۰ کلنی مشکوک به جنس لاکتوباسیلوس، در بررسی مولکولی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، برای ۲۳ جدایه قطعه‌ای به طول حدود ۱۵۴۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۱) که به‌عنوان جنس لاکتوباسیلوس شناسایی شدند. ۲۳ لاکتوباسیلوس شناسایی شده برای شناسایی گونه، تحت ارزیابی-های مولکولی شامل هضم آنزیمی و تعیین توالی نوکلئوتیدی قرار گرفتند. با استفاده از آنزیم *HinfI* قطعات تکثیر شده برش داده شدند. الگوهای هضم آنزیمی متفاوتی برای جدایه‌های مختلف به‌دست آمد (شکل ۲). به‌طور کلی از تعداد ۲۳ جدایه بررسی شده به روش هضم آنزیمی، ۸ الگوی هضم آنزیمی متفاوت که تحت-عنوان الگوهای P1 الی P8 نامگذاری شدند، به‌دست آمد (شکل A و ۲ و B). الگوهای هضمی متفاوت حاکی از وجود گونه‌های مختلف بود. هرچند الگوهای هضم آنزیمی به‌دست‌آمده روشی مناسب برای تفکیک گونه‌های باکتریایی است ولی به‌منظور ارزیابی دقیق‌تر، از هر الگوی هضم آنزیمی متفاوت یک نمونه تعیین توالی شد. نتایج تعیین توالی جدایه‌ها با الگوهای هضم آنزیمی متفاوت در شکل ۲ نشان داد *انتروکوکوس فاسیوم* و لاکتوباسیلوس سالیواریوس گونه‌های غالب بودند. در بین جدایه-های لاکتوباسیلوس، یک جدایه مربوط به لاکتوباسیلوس سالیواریوس گزارش شد.

۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C، ناحیه مهاری تشکیل شده بررسی و با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد (۲۰).

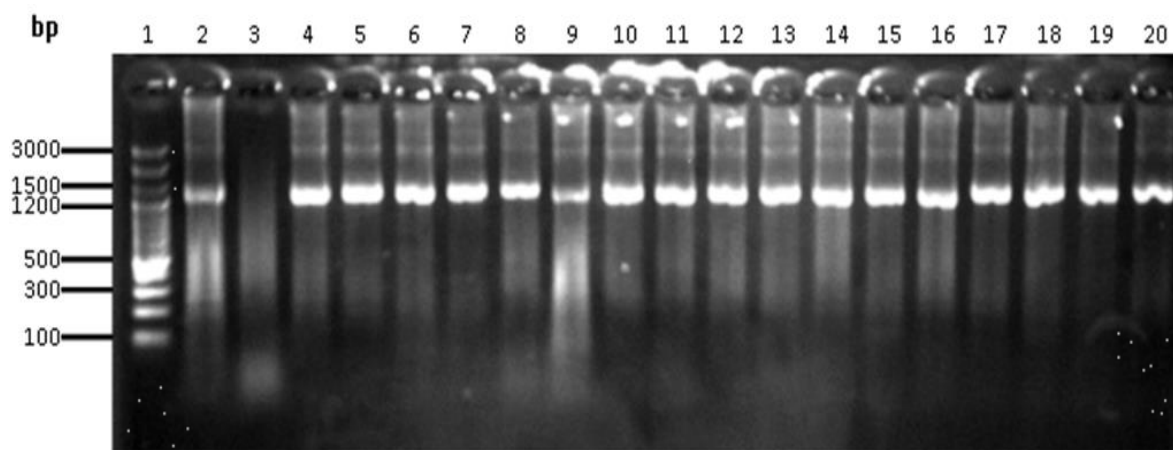
سنجش هیدروفوبیستی باکتری

برای سنجش هیدروفوبیستی سطحی باکتری، از آزمون اتصال باکتری به هیدروکربن گزین و تولئن استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۴۰ نانومتر تهیه (جذب نوری اولیه) و سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از هریک از هیدروکربن‌ها، ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اضافه شد. پس از هم زدن به مدت دو دقیقه، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در یک محل ثابت قرار گرفت. پس از این زمان جذب نوری فاز آبی در طول موج ۶۴۰ نانومتر ثبت (جذب ثانویه) و درصد سلول-های متصل به هیدروکربن با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد. در این آزمایش باکتری لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس LA5 به‌عنوان نمونه شاهد برای مقایسه با لاکتوباسیلوس سالیواریوس بررسی شد (۲۱).

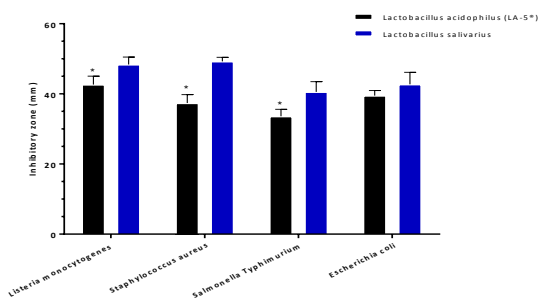
درصد سلول‌های متصل به هیدروکربن اکتان = {جذب اولیه - جذب ثانویه/ جذب اولیه} × ۱۰۰

روش آماری

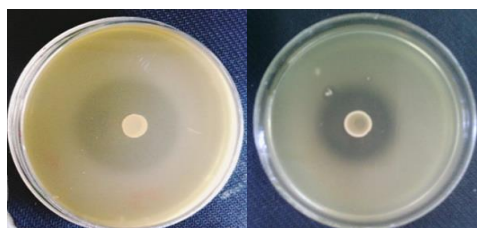
داده‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی دانکن در برنامه SPSS نسخه ۲۲ (IBM corp., NY, USA) در سطح معنی‌دار $P < 0.05$ آنالیز شدند. برای رسم منحنی از نرم‌افزار GraphPad (San Diego California USA) استفاده شد. تمامی تست‌های میکروبی و هیدروفوبیستی حداقل در سه تکرار انجام گرفتند.



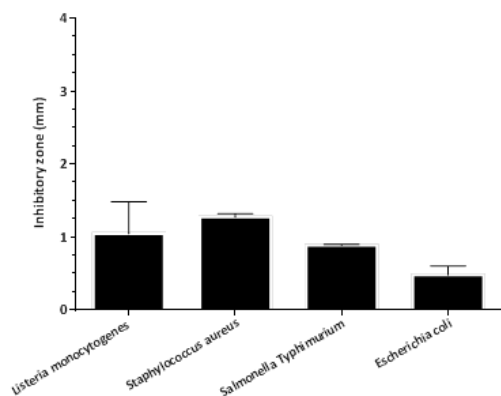
شکل ۱. محصولات PCR به‌اندازه ۱۵۴۰ جفت باز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* تعدادی از جدایه‌های باکتریایی (باسیل‌ها و کوکسی‌ها) بارگذاری شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰bp (سینا کلون، ایران)، چاهک ۲: لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس (کنترل مثبت)، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک‌های ۴-۲۰: محصولات PCR تکثیر شده از جدایه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک.



شکل ۳. قطر هاله رشدنیافتگی باکتری‌های بیماری‌زای بررسی شده بر حسب میلی-متر در مواجهه با لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 (کنترل) نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین گروه تیمار و گروه کنترل است.



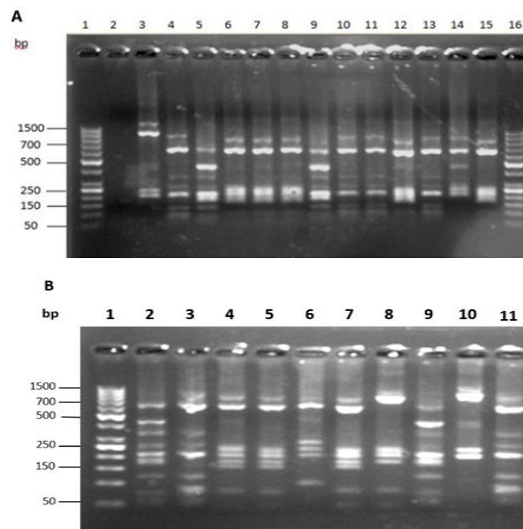
شکل ۴. هاله ممانعت از رشد مایع رویی لاکتوباسیلوس سالیواریوس علیه باکتری گرم منفی (اشریشیا کلی) (سمت راست). باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) (سمت چپ).



شکل ۵. قطر هاله رشدنیافتگی باکتری‌های بیماری‌زای بر حسب میلی-متر در مواجهه با مایع رویی لاکتوباسیلوس سالیواریوس

هیدروفوبیستی لاکتوباسیلوس سالیواریوس

هیدروفوبیستی سطحی لاکتوباسیلوس سالیواریوس با استفاده از اتصال به گزین و تولن در شکل ۶ آورده شده است. هیدروفوبیستی لاکتوباسیلوس سالیواریوس به گزین و تولن به ترتیب ۵۵/۶ و ۵۵/۳ درصد گزارش شد که حاکی از هیدروفوبیستی متوسط و مناسب جدایه بود.



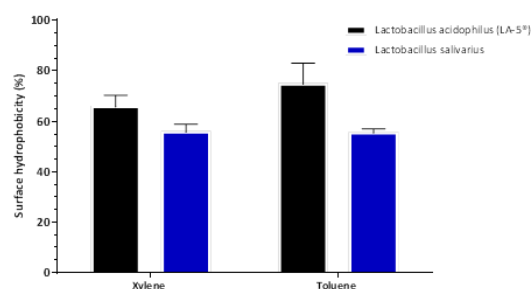
شکل ۲. الگوی هضم آنزیمی محصولات PCR ناحیه ژنومی *16S rRNA*، ۲۳ جدایه لاکتوباسیلوس تأیید شده که با استفاده از آنزیم *HinfI* انجام گرفته است (بارگذاری شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد). A: چاهک‌های ۱ و ۱۶: مارکر مولکولی ۵۰ bp (سینا کلون، ایران)، چاهک ۳: الگوی P1، چاهک‌های ۴، ۱۰، ۱۱ و ۱۳: الگوی P2، چاهک ۵: الگوی P3، چاهک‌های ۶، ۷، ۸، ۱۲ و ۱۵: الگوی P4، چاهک ۱۴: الگوی P5، B: چاهک ۱: مارکر مولکولی ۵۰ bp، چاهک ۲: الگوی P6، چاهک‌های ۳ و ۱۱: الگوی P2، چاهک‌های ۴، ۵ و ۷: الگوی P4، چاهک ۶: الگوی P7، چاهک ۸: الگوی P8، چاهک ۹: الگوی P3، چاهک ۱۰: الگوی P1، چاهک ۱۱: الگوی P2

فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس سالیواریوس

توانایی مهار رشد جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5 روی باکتری‌های بیماری‌زا که به صورت هاله ممانعت از رشد بیان می‌شود، در شکل ۳ آورده شده است. نتایج آزمون ضد میکروبی نشان داد که لاکتوباسیلوس سالیواریوس اثر مهاری روی باکتری‌های لیستریا مونوسییتوزنز، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی‌موریوم و استافیلوکوکوس اورئوس دارد و به ترتیب هاله ممانعت از رشدی به قطر ۴۸/۳۷، ۴۲/۷۲، ۴۰/۵۵ و ۴۹/۲۷ میلی‌متر ایجاد کرد که اختلاف معنی‌داری ($P < 0.05$) با باکتری استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 داشت.

اثرات مهاری مایع رویی جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس روی باکتری‌های بیماری‌زا که به صورت هاله ممانعت از رشد است (شکل ۴)، در شکل ۵ آورده شده است.

نتایج بررسی Aziz و همکاران (۲۰۰۹) روی باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر گاو نشان داد که از مجموع ۲۷ جدایه رشد یافته در محیط MRS، با استفاده از شناسایی بیوشیمیایی، فقط ۵ باکتری اسیدلاکتیک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی تحت گونه بولگاریکوس، لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه کرموریس، لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس وجود دارند (۱۵). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، باکتری اسیدلاکتیک غالب در شیر گاومیش گزارش شد. این در حالی بود که در شیر گاو و گوسفند به ترتیب استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوکوکوس لاکتیس تحت گونه لاکتیس، گونه‌های غالب بودند (۱۴). مطالعات این محققان نشان داد که به دلیل تنوع بالای باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر گاومیش، باکتری اسیدلاکتیک شیر این حیوان، مناسب برای استفاده به عنوان استارتر در کره است. در این مطالعه خصوصیات عملکردی و تکنولوژیک جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک بررسی نشد (۱۴). بررسی‌های مولکولی در مطالعه حاضر نشان داد از تعداد کل باکتری‌های اسیدلاکتیک کوکوسی، حدود ۹۷ درصد *انتروکوکوس فاسیوم* و حدود ۳ درصد *انتروکوکوس کازئیفلووس* بودند. Martin و همکاران (۲۰۰۶) برای اولین بار لاکتوباسیلوس سالیواریوس CECT را از مدفوع نوزاد شیرخوار جداسازی و به روش مولکولی تشخیص دادند. این جدایه ویژگی‌های ضد میکروبی مناسبی روی باکتری‌های بیماری‌زای مطالعه شده نشان داد و روند بقای ایده‌آل در شرایط دستگاه گوارشی را نیز از خود نشان داد. نتایج این مطالعه مشخص کرد که علت خاصیت ضد میکروبی این جدایه به دلیل تولید لاکتات، استات و پراکسید هیدروژن است (۸). توانایی در مهار رشد باکتری‌های فسادزا و بیماری‌زا از مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک به شمار می‌رود و به عنوان یکی از معیارهای پیشنهادی در بررسی خصوصیات یک باکتری پروبیوتیک مطرح است. اگر باکتری چنین توانایی در محافظت از میزبان در مقابل اجرام بیماری‌زا داشته باشد، می‌تواند به عنوان باکتری پروبیوتیک مناسب مطرح شود و در ادامه لازم است تست‌های تعیین خصوصیت پروبیوتیکی از جمله توانایی تحمل شرایط دستگاه گوارش، بیماری‌زا نبودن، کلونیزه شدن در مخاط دستگاه گوارش و رقابت و حذف عوامل بیماری‌زا انجام پذیرد (۲۴). نتایج این مطالعه نشان داد که لاکتوباسیلوس سالیواریوس جداسازی شده در این مطالعه اثرات ضد میکروبی



شکل ۶. درصد هیدروفوبیستی سطحی لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 (نمونه کنترل) با استفاده از گزین و تولن.

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به اینکه جزئیات کاملی در زمینه جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از شیر خام گاومیش وجود ندارد، بنابراین مطالعات و بررسی برای شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک از شیر خام گاومیش انجام شد. مرحله اول بررسی فنوتیپ باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از روش‌های کلاسیک و مرحله دوم استفاده از روش‌های مولکولی بود. در هر مرحله مشخص شد که تعداد جدایه‌های کوکوسی بیشتر از باسیل بود.

تنوع باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات غذایی مختلف و در شرایط جغرافیایی گوناگون زیاد است. این تنوع در محصولات لبنی تولید و عرضه شده در دنیا نیز بسیار پیچیده و بالا است که می‌تواند انگیزه‌ای برای غربال‌گری این محصولات با هدف دستیابی به سویه‌های مناسب با خصوصیات عملکردی و تکنولوژیک ویژه باشد (۲۲). در بررسی نمونه‌های شیر تخمیری گاو، گوسفند، گاو کوهان‌دار و مادیان در کشور مغولستان، لاکتوباسیلوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس هلوئیکوس، به عنوان باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب گزارش شدند (۲۲). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ روی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیر گاومیش در کشور اندونزی انجام گرفت، نشان داده شد که غالب جدایه‌ها مربوط به لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس پنتوسوس، لاکتوباسیلوس پلانناروم و لاکتوکوکوس لاکتیس هستند (۲۳). در مطالعه Messaoudi و همکاران (۲۰۱۱)، به منظور جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از مدفوع مرغ، اکثریت جدایه‌ها متعلق به جنس لاکتوباسیلوس بود. لاکتوباسیلوس سالیواریوس، ۱۹/۴ درصد کل باسیلوس‌های جداسازی شده را به خود اختصاص داد. سه سویه مختلف لاکتوباسیلوس سالیواریوس (SMXD51، MMS122، MMS151) اثرات ضد میکروب چشمگیری بر کمپیلوباکتر ژرونی و کمپیلوباکتر کلی داشت. این ویژگی به دلیل تولید باکتری‌سین از سوی این سویه‌ها گزارش شد (۱۲).

لاکتوکوکوس، لوکونستوک، لاکتوباسیلوس و اُنکوکوس قرار گرفتند. در ۵۲ جدایه لاکتوباسیلوس تست مقاومت به اسید معده، نمک‌های صفاوی، بررسی خصوصیات ضد میکروبی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک انجام پذیرفت که نتایج وجود ویژگی پروبیوتیکی مناسب در سه گونه را نشان داد (۲۷).

مطالعات مختلفی درباره بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک صورت گرفته که در برخی از آنها علت اصلی این خصوصیت، تولید پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی گزارش شده است؛ ویژگی‌ای که متأثر از نوع و جنس گونه است. یکی از دلایل مهم ویژگی ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک مربوط به تولید ترکیبات شبه باکتریوسین است. باکتریوسین‌ها، پپتیدهای سنتز شده از سوی ریبوزوم‌ها هستند که از قدرت ضد میکروبی بالایی برخوردارند. طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله باکتری‌های اسیدلاکتیک قادر به تولید آنها هستند (۲). در این مطالعه برای اینکه مشخص شود خصوصیات ضد میکروبی باکتری مربوط به کدام ترکیب باکتری است، مایع رویی باکتری تهیه و سپس به ترتیب برای حذف اثرات pH و پراکسید هیدروژن موجود در مایع رویی از سود (رساندن pH به میزان خنثی) و کاتالاز استفاده شد. در نتیجه، عمده ترکیب ضد میکروب موجود در مایع رویی، ترکیبات شبه باکتریوسین تصور می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که بخشی از اثرات ضد میکروبی جدایه لاکتوباسیلوس مربوط به ترکیبات شبه باکتریوسین است، چرا که مایع رویی تمیاز شده با سود و کاتالاز، اثرات ضد میکروبی نشان داد. بیشترین اثر ضد میکروبی پالیده بر علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس آرنوس با قطر هاله ممانعت از رشد ۱/۳ میلی‌متر بود و کمترین اثر ضد میکروب هم مربوط به باکتری اشریشیا کلی (قطر هاله ممانعت ۰/۵ میلی‌متر) می‌شد.

به‌طور کلی، فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین‌ها علیه میکروارگانیسمی است که ارتباط نزدیکی با میکروارگانیسم تولیدکننده آن دارد. در بررسی انجام شده روی ۵۴ نمونه شیر در ایران، ۱۹۸ جدایه مختلف باکتری اسیدلاکتیک به روش فنوتیپی جداسازی و شناسایی شد. همه جدایه‌ها تقریباً اثر ضد میکروبی بر علیه اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس آرنوس نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این خاصیت ضد میکروبی بیشتر مربوط به تولید اسید آلی از سوی این باکتری‌ها است و پراکسید هیدروژن نقشی ندارد. همچنین ثابت شد که اثر ضد میکروبی ۴ جدایه تحت مطالعه روی استافیلوکوکوس آرنوس مرتبط با تولید مواد مهار کننده شبه باکتریوسین است (۲۸). Marques و همکاران (۲۰۱۷) اثرات

منحصربه‌فردی دارد؛ به طوری که در مقایسه با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5، اثرات ضد میکروبی معنی‌داری نشان داد. بیشترین اثر ضد میکروبی جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس به ترتیب در استافیلوکوکوس آرنوس (۴۹/۲۷ میلی‌متر)، لیستریا منوسیتوژنز (۴۸/۳۷ میلی‌متر) اشریشیا کلی (۴۲/۷۲ میلی‌متر) و سالمونلاتیفی موریوم (۴۰/۵۵ میلی‌متر) دیده شد. این اثرات درباره لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب ۳۳/۶۰، ۳۹/۴۹، ۳۷/۳۷ و ۴۲/۶۵ میلی‌متر بود. در مجموع باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها، حساسیت بیشتری نسبت به جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس نشان دادند. در مطالعه Iranmanesh و همکاران (۲۰۱۲) پیرامون ویژگی‌های ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از شیر و ماست، نشان داده شد که از مجموع ۱۶۸ جدایه جدا شده از محیط MRS، فقط ۷۷ درصد جزو باکتری‌های اسیدلاکتیک بودند و از این تعداد ۳۳ جدایه خواص ضد میکروبی بر علیه برخی عوامل بیماری‌زا از جمله لیستریا منوسیتوژنز، استافیلوکوکوس آرنوس و سالمونلا انترتیدیس داشتند (۲۵).

Karami و همکاران (۲۰۱۷) اثرات ضد میکروبی جدایه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از نمونه‌های لبنی شامل شیر گاو، شیر گاو میش، پنیر و ماست علیه استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا را بررسی کردند. نتایج نشان داد سه جدایه لاکتوباسیلوس آلیمانتاریوس، لاکتوباسیلوس ساکای و لاکتوباسیلوس کلونوایدس اثرات ضد میکروبی متوسط (هاله ممانعت کمتر از ۱۵ میلی‌متر) و قوی (هاله ممانعت از رشد بالای ۱۵ میلی‌متر) داشتند (۲۶). Mercan و همکاران (۲۰۱۵) اثرات ضد میکروبی ۴ جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس جدا شده از مدفوع مرغ را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس) و منفی (اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و یرسینیا انترکولیتیکا) بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها نشان داد که هر ۴ جدایه، توانایی مهار رشد هر دو دسته باکتری‌های گرم مثبت (به استثناء باسیلوس سرئوس) و منفی را داشتند. این محققان، ویژگی‌های ضد میکروبی مشاهده شده را به تولید باکتریوسین و ترکیبات شبه باکتریوسین نسبت دادند (۱۱). در مطالعه‌ای تنوع باکتری‌های اسیدلاکتیک دانه کفیر استفاده شده در کشور برزیل با هدف جداسازی جدایه لاکتوباسیلوس با خصوصیت پروبیوتیک انجام پذیرفت. ۱۰۸ جدایه جدا شده به روش مولکولی و برش DNA ریبوزومی و سکانس ژن 16S rRNA تعیین گونه شدند که در مجموع در ۱۱ جنس شامل

از آنجا که جداسازی و غربال میکروارگانیسم‌ها از منابع طبیعی، روشی مؤثر برای به‌دست آوردن سویه‌های مفید با خصوصیات ژنتیکی ثابت و استفاده از آنها در محصولات صنعتی است، لذا این مطالعه با هدف بررسی امکان شناسایی لاکتوباسیلوس سالیواریوس به‌عنوان باکتری پروبیوتیک بالقوه انجام شد. نتایج این مطالعه نشان داد که فراوانی لاکتوباسیلوس به‌عنوان یکی از جنس‌های مهم باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر خام گاو میش بسیار پایین است و به‌نظر می‌رسد، دیگر جنس‌ها از فراوانی بیشتری در این شیر برخوردار باشند. لاکتوباسیلوس سالیواریوس جدا شده از شیر گاو میش در این مطالعه اثرات ضد میکروبی منحصربه‌فردی در مقایسه با لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس LA-5 نشان داد. مطالعات همچنین نشان داد که بخشی از این خصوصیت مربوط به ترکیبات شبه باکتریوسین است که این نیاز به مطالعات تکمیلی دارد. با انجام دیگر آزمون‌های مرسوم و استاندارد بررسی خصوصیات پروبیوتیک در جدایه، می‌توان از جدایه فعلی به‌عنوان یک پروبیوتیک جدید در صنایع مختلف از جمله صنایع لبنی استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاران محترم آزمایشگاه میکروبی‌شناسی مواد غذایی و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌خاطر همکاری در اجرای این پژوهش کمال امتنان را به‌عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

مواد شبه باکتریوسین لاکتوباسیلوس کورواتوس P99 را بر لیستریا منوسیتوزنز در محیط آزمایشگاهی و پنیر پراتو بررسی کردند. حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی مایع رویی حاوی مواد شبه باکتریوسین بر علیه باکتری به‌ترتیب ۱۵/۶ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. این مایع باعث کنترل رشد لیستریا منوسیتوزنز در پنیر شد (۴).

یکی از معیارهای باکتری‌های پروبیوتیک، مرتبط با توانایی باکتری در کلونیزه شدن در دستگاه گوارش انسان و حیوان است. عوامل مختلفی در این اتصال مؤثر هستند که یکی از آنها هیدروفوبیستی سطح باکتری است. هرچقدر باکتری هیدروفوب باشد، توانایی بیشتری در اتصال به سطوح دارد. هیدروفوبیستی سطحی باکتری، متأثر از محتوای غشاء سیتوپلاسمی باکتری است. باکتری‌هایی با قدرت هیدروفوبی بالا، کاندیداهای مناسبی برای استفاده به‌عنوان پروبیوتیک هستند (۲۹). هیدروفوبیستی لاکتوباسیلوس سالیواریوس به گزلیین و تولئین به‌ترتیب ۵۵/۶ و ۵۵/۳ درصد گزارش شد. این در حالی بود که این مقدار برای لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس LA-5، ۶۵/۶ و ۷۴/۶ درصد بود. هر دو هیدروکربن آب‌گریز هستند و روی فاز آبی، یک فاز آلی تشکیل می‌دهند. در بررسی انجام‌شده درباره هیدروفوبیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده در حضور گزلیین، نتایج نشان داد که دو گونه از فعالیت هیدروفوبی بالا (۴۸ و ۵۲ درصد) در مقایسه با سویه استاندارد (۳۷ درصد) برخوردار بودند (۲۱). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که هیدروفوبیستی سطحی جدایه لاکتوباسیلوس، اختلاف معنی‌داری با باکتری استاندارد ندارد.

References

- Perin LM, Miranda RO, Todorov SD, Franco BDGdM, Nero LA. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *Int J Food Microbiol.* 2014;185:121-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.001> PMID:24960293
- Yang E, Fan L, Jiang Y, Doucette C, Fillmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express.* 2012;2(1):48. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-48> PMID:22963659 PMID:PMC3488010
- de Almeida Júnior WLG, Ferrari ÍdS, de Souza JV, da Silva CDA, da Costa MM, Dias FS. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control.* 2015;53(0):96-103. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.01.013>
- Marques JdL, Funck GD, Dannenberg GdS, Cruzen CEDS, Halal SLME, Dias ARG, et al. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Microbiol.* 2017;63:159-63. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.008> PMID:28040164
- Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Guéguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008;126(3):278-85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015> PMID:17889388

6. Jeronimo-Ceneviva A, de Paula A, Silva L, Todorov S, Franco BM, Penna A. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. *Probiotics Antimicro Prot.* 2014;6(3-4):141-56. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9166-2> PMID:25117002
7. Rooney ML. Introduction to active food packaging technologies. In: Han J, editor. *Innovations in food packaging*. Amsterdam: Elsevier Ltd; 2005. <https://doi.org/10.1016/B978-012311632-1/50037-1>
8. Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol.* 2006;112(1):35-43. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.011> PMID:16843562
9. Sun E, Ren F, Liu S, Ge S, Zhang M, Guo H. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus salivarius* Ren, a probiotic strain with anti-tumor activity. *J Biotechnol.* 2015;210:57-8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.399> PMID:26133929
10. Luo Z, Gasasira v, Huang Y, Liu D, Yang X, Jjiang S, Hu W. Effect of *Lactobacillus salivarius* H strain isolated from Chinese dry-cured ham on the color stability of fresh pork. *Food Sci Hum Wellness.* 2013;2(3-4):139-45. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2013.11.001>
11. Mercan E, İspirli H, Sert D, Yilmaz mT, Dertli E. Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. *Arch Microbiol.* 2015;197(9):1041-9. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1141-0> PMID:26267164
12. Messaoudi S, Kergourlay G, Rossero A, Ferchichi M, Prévost H, Drider D, Manai M, Dousset X. Identification of lactobacilli residing in chicken ceca with antagonism against *Campylobacter*. *Int Microbiol.* 2011;14(2):103-10. PMID:22069154
13. Zacharof MP, Lovitt RW. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. *APCBEE Procedia.* 2012;2:50-6. <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>
14. Chowdhury A, Hossain MN, Mostazir NJ, Fakruddin M, Md. Billah M. Screening of *Lactobacillus* spp. from Buffalo Yoghurt for Probiotic and Antibacterial Activity. *J Bacteriol Parasitol.* 2012;3(8):1-5. <https://doi.org/10.4172/2155-9597.1000156>
15. Aziz T, Khan H, Bakhtair SM, Naurin M. Incidence and relative abundance of lactic acid bacteria in raw milk of Buffalo, Cow and Sheep. *J Anim Plant Sci.* 2009;19(4):168-73.
16. Iranmanesh M, Ezzatpanah H, Mojjani N . Antibacterial activity and cholesterol assimilation of lactic acid bacteria isolated from traditional Iranian dairy products. *LWT - Food Sci Technol.* 2014;58(2):355-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.005>
17. Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(22):4692-3. <https://doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>
18. Scarpellini M, Mora D, Colombo S, Franzetti L. Development of genus/species-specific pcr analysis for identification of carnobacterium strains. *Curr Microbiol.* 2002;45(1):24-9. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0043-3> PMID:12029523
19. Awaisheh SS, Ibrahim SA. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against different pathogens found in vacuum-packaged meat products. *Foodborne Pathog Dis.* 2009;6(9):1125-32. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0272> PMID:19694551
20. Buncic S, Avery SM, Moorhead SM. Insufficient antilisterial capacity of low inoculum *Lactobacillus* cultures on long-term stored meats at 4 °C. *Int J Food Microbiol.* 1997;34(2):157-70. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(96\)01181-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(96)01181-6)
21. Sahoo TK, Jena PK, Nagar N, Patel AK, Seshadri S. In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *labeo rohita* and *catla catla*. *Probiotics Antimicro Prot.* 2015;7(2):126-36. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9184-8> PMID:25634754
22. Yu J, Wang WH, Menghe BLG, Jiri MT, Wang HM, Liu WJ, et al. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *J Dairy Sci.* 2011;94(7):3229-41. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3727> PMID:21700007
23. Rizqiati H, Nurwantoro, Mulyani S, Febrisiantosa A. Isolation and identification of lactic acid bacteria from pampangan buffalo milk of south Sumatera, Indonesia. *Int J Pharm Biol Sci.* 2016;2(4):1-12.
24. Anandharaj M, Sivasankari B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. *J Biosci*

Bioeng. 2014;118(2):153-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.015>
PMID:[24613732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24613732/)

25. Iranmanesh M, Ezzatpanah H, Mojgani N, Karimi Torshizi MA, Aminafshar M, Mohamad Maohamadi M. Isolation of lactic acid bacteria from ewe milk, traditional yoghurt and sour buttermilk in Iran. *European J Food Res Rev.* 2012;2(3):79-92.
26. Karami S, Roayaei M, Hamzavi H, Bahmani M, Hassanzad-Azar H, Leila M, et al. Isolation and identification of probiotic *Lactobacillus* from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. *Int J Pharma Investig.* 2017;7(3):137-41. https://doi.org/10.4103/jphi.JPHI_8_17
PMID:[29184826](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29184826/) PMCID:PMC5680649
27. Zanirati DF, Abatemarco Jr M, Sandes SHdC, Nicoli JR, Nunes AC, Neumann E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe.* 2015;32:70-6.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>
PMID:[25542841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25542841/)
28. Taheri P, Samadi N, Khoshayand MR, Fazeli MR, Jamalifar H, Ehsani MR. A study on the antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional iranian milk samples. *Int J Agri Sci Res.* 2011;2(1):27-34.
29. Li Q, Liu X, Dong M, Zhou J, Wang Y. Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int J Agri Policy Res.* 2015;3(2):84-92.