Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 1 (March-April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation and identification of *Lactobacillus* bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman

Najme Rokhtabnak, Mouj Khaleghi, Hosseyn Ali Sasan

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/02/13
Accepted: 2015/12/26
Available online:2016/03/10

Article Subject:
Food Microbiology

IJMM 1395; 10(1): 24-34

Corresponding author at:
Dr. Mouj Khaleghi

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Tel:
+98 34 31322046

Email:
m.khaleghi@uk.ac.ir

Abstract

Background and Aim: As lactobacilli possess an antagonistic growth property ,therefore they may be used as bioprotective agents for infection control .The aim of this study was to investigate the antagonistic effect of lactobacilli isolated from local dairy.

Materials and Methods: In this study 26 species of Lactobacilli were isolated from milk ,homemade yoghurt and cheese .Each isolated bacteria was tested for its tolerance to acidic environments(at pH ,0.2 ,0.3 and 0.4) and bile salt concentrations(0.3,0.5 and 1% w/v) .Also ,isolates were further tested for their antimicrobial activity against common pathogenic bacteria such as *Enterococcus feacalis* ,*Listeria monocytogenes* ,*Staphylococcus aureus* PTCC 1112, *Escherichia coli* PTCC 1330 *and Bacillus cereus* PTCC 1015 by using the agar well method. Then the strains that are not only resistant to acidic conditions and bile salts but also have antimicrobial activity, were identified by 16S rRNA gene sequencing.

Results: In this study, most of isolated Lactobacilli were found to inhibit growth of pathogens (96.15%). 61.5% and 84.62% of isolated lactobacilli tolerated to pH 2 and 0.3% bile salt. Only two strains, 53C and 22CL, were more resistant to pH 2 and high concentration of bile salt. The Phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequencing revealed that two strains (53C and 22CL) belong to species of *Lactobacillus casei*.

Conclusions: According the results the two isolated resistant strains can be employed as probiotic starter in probiotic dairy products preparation.

Key Words: *Lactobacillus*, probiotic, antimicrobial, 16S rRNA gene

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Ar

How to cite this article:

Rokhtabnak N, Khaleghi M, Sasan H. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :24-34

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵
Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی و شناسایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* با پتانسیل پروبیوتیکی از لبنیات سنتی کرمان

نجمه رخ تابناک، موج خالقی، حسینعلی ساسان

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۴
پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۵
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
موضوع:
میکروبیولوژی غذایی
IJMM 1395; 10(1): 24-34

نویسنده مسئول:
دکتر موج خالقی
گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان
تلفن: ۰۳۴۳۱۳۲۲۰۴۶
پست الکترونیک:
m.khaleghi@uk.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: لاکتوباسیلوس‌ها متداول‌ترین سویه‌های پروبیوتیکی هستند که دارای خصوصیت ضدمیکروبی نیز می‌باشند. هدف از این پژوهش، مطالعه خصوصیت پروبیوتیکی و اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌های بومی جدا شده از لبنیات می‌باشد.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۲۶ سویه لاکتوباسیلوس از نمونه‌های شیر، ماست و پنیر بومی، جداسازی شدند. تمامی جدایه ها ازنظر مقاومت به اسید (pH های ۲، ۳ و ۴) و غلظت‌های نمک‌های صفراوی (۰/۳، ۰/۵ و ۱٪ وزنی / حجمی) مورد بررسی قرار گرفتند. اثر ضد میکروبی این جدایه ها بر روی باکتری‌های پاتوژن *لیستریا منوسیتوژنز*، *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیا کلی* PTCC 1330، *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112 و *باسیلوس سرئوس* PTCC 1015 با استفاده از روش چاهک، مطالعه شد. سپس سویه‌های مقاوم به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی که اثر ضدمیکروبی خوبی از خود نشان دادند، توسط توالی یابی ژن 16S rRNA شناسایی شدند.

یافته‌ها: در پژوهش حاضر ۹۶/۱۵٪ جدایه ها توانستند رشد باکتری‌های پاتوژن را مهار نمایند. ۶۱/۵٪ جدایه ها به pH ۲ و ۸۴/۶۲٪ به غلظت ۰/۳٪ نمک صفراوی مقاوم بودند ولی تنها دو سویه 53C و 22CL بیشترین تحمل را در شرایط اسیدی و غلظت بالای نمک‌های صفراوی از خود نشان دادند. بر اساس آنالیز فیلوژنتیکی بر پایه توالی یابی 16S rRNA مشخص گردید این دو سویه به گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* تعلق دارند.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های به‌دست‌آمده می‌توان از دو سویه مقاوم جدا شده به‌عنوان آغازگرهای پروبیوتیکی در تهیه فراورده‌های لبنی پروبیوتیک، استفاده نمود.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس*، پروبیوتیک، ضدمیکروبی، ژن 16S rRNA

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

مقدمه

کلمه پروبیوتیک در معنی لغوی، به معنای «براي زندگي» مي‌باشد و متضاد کلمه پادزیست به مفهوم ضد حیات است. اصطلاح پروبیوتیک به میکروارگانیسم‌های زنده‌اي اطلاق مي‌شود که در ضمن عبور از دستگاه گوارش زنده مانده و براي سلامتي میزبان مفید هستند و باعث بهبود در تعادل میکروبي روده میزبان شده و بدین ترتیب بر سلامتي میزبان اثر مي‌گذارند (۱). مشاهده شده که پروبیوتیک‌ها داراي فواید متعددي از جمله واکنش‌هاي ضدمیکروبی، تحریک پاسخ‌هاي ایمني، اثر بر فعالیت‌هاي متابولیکي روده، کاهش کلسترول خون، جلوگیري از بیماری‌های گوارشي مانند اسهال، پیشگیري از سرطان و رشد تومور و یا بروز مجدد آن، کاهش مشکلات مربوط به عدم تحمل لاکتوز و کاهش علائم آلرژي مي‌باشند (۲). امروزه تولید محصولات پروبیوتیک وسعت جهانی یافته است و به علت مزایای استفاده از پروبیوتیک ها در افزایش سطح سلامت افراد، مشتریان زیادی به سمت مصرف این محصولات جلب شده اند. اولین محصولات پروبیوتیکی شیر تخمیر شده در اروپا در سال ۱۹۸۰ میلادی معرفی شده است (۳). از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده اند. در این میان جنس لاکتوباسیلوس به‌عنوان متداول‌ترین ارگانیسم در تولید محصولات پروبیوتیکی شناخته و معرفی شده است (۴). باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل

www.SID.ir

گروه‌های جور تخمیر و ناجور تخمیر می‌باشند که به‌عنوان کشت آغازگر در صنایع لبنی استفاده می‌شوند و به‌طور طبیعي در محیط‌هاي مختلف از جمله لبنیات، گوشت، سبزی‌ها، غلات و گیاهان و هر کجا که بتوانند تخمیر انجام دهند، یافت مي‌شوند (۶، ۵). از طرف دیگر، برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان فلور طبیعي دستگاه گوارش، دهان و دستگاه ادراري-تناسلي در انسان و حیوانات نیز شناخته شده‌اند (۷). مهم‌ترین جنس‌هاي باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل: *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *انتروکوکوس*، *استرپتوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *لوکونوستوک* و *بیفیدوباکتریوم* مي‌باشند (۸). جنس لاکتوباسیلوس بزرگ‌ترین جنس در گروه هتروژن باکتری‌های اسیدلاکتیک است. درحال حاضر بیش از صد گونه از این جنس شناسایی شده است (۴). لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت، بدون اسپور و کاتالاز منفی هستند که بر اساس مسیر تخمیر قند و محصول نهایی، به سه گروه جور تخمیر اجباری، ناجور تخمیر اختیاری و ناجور تخمیر اجباری تقسیم می‌شوند (۷). جنس لاکتوباسیلوس به دلیل توانایی‌شان در تخمیر و نیز اهمیت شان در سلامتی انسان، به‌عنوان پروبیوتیک مورد توجه زیادی قرار گرفته اند (۹). تحقیقات نشان داده است که *این باکتری‌ها* اثر ممانعتی بسیار خوبی بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا دارند، بنابراین امروزه سعی بر آن است تا از این باکتری‌ها به طور مستقیم و یا از باکتریوسین های خالص شده آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده‌های بیولوژیک در صنایع غذایی استفاده شوند (۷). از طرف دیگر این باکتری‌ها به علت عدم بیماری‌زایی، به‌عنوان ارگانیسم‌هاي بي‌خطر (GRAS) شناخته شده‌اند. از ویژگی‌های مهم دیگر برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس، توان تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی است که وجود این توانایی از جمله خصوصیات پروبیوتیکی است (۱۰). با توجه به کاربرد لاکتوباسیلوس‌ها در صنایع تخمیری به‌ویژه صنعت لبنیات و حضور این باکتری‌ها در دستگاه‌های گوارش و ادراری تناسلی پستانداران، تحقیقات گسترده‌ای در خصوص مطالعه اثرات این باکتری‌ها بر پاتوژن‌ها و همچنین تأثیر آن‌ها بر سلامت میزبان صورت گرفته است. در این مطالعات مشخص گردیده که سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس قادرند به خوبی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* و سویه‌های مهاجم *اشریشیا کلی* ممانعت به عمل آورند (۳، ۱۱-۱۴).

امروزه تولید محصولات لبنی (مانند ماست و پنیر) به طور عمده با استفاده از آغازگرهای تجاری مشخص، باعث شده که این محصولات نسبت به محصولات تولیدی با روش‌های سنتی، از عطر و طعم مطلوبی برخوردار نباشند (۱۵). به همین دلیل امروزه سویه‌های بومی باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت ویژه‌ای در صنایع لبنی یافته‌اند، چرا که این سویه‌ها علاوه بر آنکه دارای خصوصیات سازگاری با شرایط همان منطقه می‌باشد، از توانایی خاص در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع فرآورده‌های تخمیری، برخوردار هستند. علاوه بر آن این سویه‌ها دارای ویژگی‌هایی از جمله مقاومت ذاتی به فاژهای مخرب و همچنین اثر ضد میکروبی نیز می‌باشند (۱۶)؛ بنابراین جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی در هر منطقه، نقش بسیار مهمی در صنعت لبنیات و همچنین سلامت افراد آن جامعه، بر عهده دارد. با توجه به اهمیت و سودمندی لاکتوباسیلوس‌ها به‌عنوان باکتری‌های پروبیوتیک و آغازگر در صنایع لبنی و همچنین روند رو به رشد مصرف لبنیات پروبیوتیک در جهان و کشورمان، بر آن شدیم تا با جداسازی و شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس بومی با خصوصیت پروبیوتیکی و مطالعه اثر ضدمیکروبی آن‌ها بر برخی از سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا، گامی در جهت تولید محصولات لبنی پروبیوتیک و افزایش سلامت افراد در جامعه، برداریم.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

تعداد ٥٤ نمونه شیر خام، ماست و پنیر سنتی از شهر کرمان جمع‌آوری و در ظروف حمل نمونه استریل و بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل گردیده و تا زمان شروع آزمایش در دمای یخچال نگهداری شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت

به‌منظور غنیسازی و حفظ *لاکتوباسیلوس‌ها*، *ابتدا نمونه‌های ماست، پنیر و شیر در محیط اختصاصی* MRS broth (The Man, Rogosa and Sharpes broth,Scharlu, German) در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از آن نمونه‌ها به محیط MRS agar (Hi Media, India) منتقل و به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی گرمخانه گذاری گردیدند. هر یک از کلنی‌های بدست‌آمده از نظر واکنش گرم و کاتالاز بررسی شدند. از باکتری‌های میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی، کشت خالص تهیه و به منظور شناسایی اولیه آن‌ها، آزمون‌هایMR-VP ، تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مالتوز، لاکتوز، مانیتول، ریبوز، رامنوز، سالیسین، سوکروز و اسکولین، توان رشد در دماهای مختلف (۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس) و بررسی تحمل

Archive of SID
www.SID.ir

غلظت‌های NaCl (۲/۵، ۴/۵ و ۶/۵ درصد)، انجام گردید.

تعیین جور تخمیر یا ناجور تخمیر بودن جدایه ها

تعیین نوع تخمیر در لاکتوباسیلوس‌ها جدا شده از لبنیات، بر اساس الگوی تخمیر قند ذکر شده در کتاب سیستماتیک باکتریولوژی Ludwig، انجام شد (۱۷). جهت انجام این آزمایش، توانایی تخمیر قندهای گلوکز، آرابینوز، مالتوز، لاکتوز، مانیتول، ریبوز، رامنوز، سالیسین، سوکروز و اسکولین و تولید گاز بررسی گردید. برای این منظور از محیط‌های کشت MRS broth و MRS-fermentation broth و لوله دورهام استفاده شد. پس از تلقیح کشت تازه (۲۴ ساعته) جدایه ها به لوله‌های آبگوشت حاوی هر یک از قندها، توانایی تخمیر و تولید گاز در طی ۷۲ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بررسی گردید.

سویه‌های میکروبی پاتوژن مورد آزمون

در این تحقیق برای بررسی اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از لبنیات بومی کرمان از سویه‌های بالینی تهیه شده از دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان (پاتوژن *لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس*) و سویه‌های استاندارد (*اشریشیا کلی PTCC 1330* ، *استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112* و *باسیلوس سرئوس PTCC 1015*) استفاده گردید.

بررسی دو خصوصیت پروبیوتیکی مقاومت به pH اسیدی و نمک‌های صفراوی در جدایه ها

جهت بررسی خصوصیت پروبیوتیکی در لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده در آزمایشگاه، دو توانایی مقاومت به pH اسیدی و تحمل غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی، مطالعه گردید:

تعیین درصد بقای سویه‌ها در شرایط اسیدی

برای این منظور از روش میکروتیترپلیت (میکروتیترپلیت های ۹۶ خانه‌ای از جنس پلی استایرن) استفاده شد (۱۶). ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشتMRS broth با pH های ۲، ۳ و ٤ به هر ردیف از چاهک‌ها انتقال یافت. سپس به هر ستون، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون هر یک از سویه‌های *جداسازی شده*، افزوده گردید. جذب نمونه‌ها هر هشت ساعت یک‌بار در طول‌موج ۶۳۰ توسط دستگاه Reader ELISA[1] صورت گرفت. pH نمونه شاهد ۶/۸ (طبق دستورالعمل شرکت) بود. جهت تعیین درصد بقای هر سویه از معادله (۱) استفاده شد(۱۸). لازم به ذکر است جهت تنظیم pH، از بافر نمک فسفات، توسط اسید کلروریک و سود (NaOH) ۱ نرمال استفاده گردید.

تعیین درصد مقاومت به نمکهای صفراوی

روش به کار رفته برای این مطالعه با استفاده از میکروپلیتهای ۹۶ خانه می‌باشد. برای این منظور از غلظت‌های ۰/۳٪، ۰/۵٪ و ۱٪ نمک مخلوط صفرا (کولات سدیم و دئوکسی کولات سدیم Q LAB, UK)، استفاده گردید. جذب نمونه‌ها هر هشت ساعت یک‌بار در طول‌موج ۶۳۰ توسط دستگاه Reader ELISA صورت گرفت. جهت تعیین درصد بقاء هر سویه از معادله (۱) استفاده شد(۱۸).

معادله ۱: $$\text{درصد بقاء} = \frac{\text{مقدار جذب در } pH2 \text{ (غلظت صفرا 0.3%)} - \text{مقدار جذب در شاهد}}{\text{مقدار جذب در شاهد}} \times 100$$

بررسی اثر ضدمیکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از لبنیات

برای بررسی اثر آنتاگونیستی از روش Arab Soleymani و همکارانش با کمی تغییر استفاده شد (۱۴). در این روش در پلیتهای حاوی MRS آگار چاهک‌هایی با قطر ۶ میلیمتر و به هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *لاکتوباسیلوس* با غلظت ۰/۵ مک فارلند تلقیح گردید. سپس پلیتها در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه برای ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت این مدت، جهت کشت سویه‌های بیماری‌زا از محیط Muller Hinton agar (Merk, Germany) و Brain and heart infusion (Merck, Germany) (برای کشت باکتریهای *لیستریا منوسیتوژنز و انتروکوکوس فکالیس*) استفاده گردید و به صورت لایه دوم به پلیتهای حاوی *لاکتوباسیلوس‌ها* اضافه شدند. سپس سویه‌های باکتریهای پاتوژن با غلظت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، بر سطح محیط کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و ثبت گردید.

استخراج DNA و تکثیر ژن 16S rRNA

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام شد و جهت تکثیر ژن16S rRNA از پرایمرهای اختصاصی (۱۹) *لاکتوباسیلوس* و پرایمرهای یونیورسال U8F و U1390R، استفاده گردید (جدول ۱).

تکثیر ژن16S rRNA در ۳۵ چرخه حرارتی و بر طبق برنامه واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ °C ، واسرشتگی هر چرخه ۳۰ ثانیه

1 ELx800-BioTek ,USA

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱ : نتایج بدست آمده در روش کشت متقاطع خطی (آنتاگونیسم میکروبی)

نام پرایمر	مشخصات پرایمر	توالی	اندازه محصول تکثیر یافته (bp)
LbLMA1	اختصاصی لاکتوباسیلوس	F: 5'-CTCAAAACTAAACAAAGTTTC-3'	۲۲۰
R16-1	اختصاصی لاکتوباسیلوس	R: 5'-CTTGTACACACCGCCCGTCA-3'	۲۲۰
U8F	یونیورسال	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	۱۴۰۰
U1390R	یونیورسال	5'-GACGGGCGGTGTACAA-3'	۱۴۰۰

در ۹۵ °C ، اتصال پرایمر در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله گسترش پرایمر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت طویل شدن نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱٪ استفاده گردید. پس از مشاهده باند اختصاصی *لاکتوباسیلوس*ها (۲۲۰ bp)، تکثیر ژن ۱۶S rRNA با استفاده از پرایمرهای یونیورسال U8F و U1390R انجام شد. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت Macrogen در کره جنوبی ارسال گردید. سپس توالی ژن ۱۶S rRNA باکتری موردنظر با توالی‌های ۱۶S rRNA سایر باکتری‌های مشابه، در سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. در نهایت با استفاده از این توالی‌های همولوگ و نرم‌افزار MEGA۴ درخت فیلوژنتیک مرتبط با باکتری رسم گردید.

محاسبات آماری

محاسبات آماری مربوط به این تحقیق توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه، آزمون Duncan مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت.

لازم به یادآوری است که تمامی آزمون‌های مورد نظر با سه تکرار انجام شدند.

یافته ها

در نتایج اولیه جهت مطالعه لاکتوباسیلوس‌های جدا شده بر طبق آزمون‌های ویژگی‌های کلنی، واکنش گرم و کاتالاز، ۸۳ سویه باکتری میله‌ای گرم مثبت و کاتالاز منفی، از ۵۴ نمونه لبنیات محلی کرمان (شیر خام، ماست و پنیر) جداسازی گردید. بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی تخمیر قند، MR-VP و توان رشد در دماهای مختلف (۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس) و بررسی تحمل غلظت‌های متفاوت NaCl (۲/۵، ۴/۵ و ۶/۵ درصد)، تعداد ۸۳ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده به ۲۶ سویه، کاهش یافت. از بین آن‌ها ۴۲/۳٪ ناجور تخمیر اجباری، ۱۵/۴٪ ناجور تخمیر اختیاری و ۴۲/۳٪ جور تخمیر اجباری شناخته شدند.

مقاومت سویه‌های جدا شده به pH های مختلف و غلظت‌های متفاوت نمک‌های صفراوی (۰/۳٪، ۰/۵٪ و ۱٪ وزنی /حجمی) با خوانش میزان جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر، طی ۸ ساعت بررسی گردید. نتایج نشان دادند میانگین رشد در pH های ۲، ۳ و ۴ در این مدت زمان، مقدار قابل توجهی نسبت به رشد جدایه‌ها در pH شاهد (۶/۸)، کمتر بود (نمودار ۱). اختلاف مورد مشاهده در بین جدایه ها از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار می‌باشد ($p<$ ۰/۰۵). برای تعیین مقاومت به اسید، بقای سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده در pH ۲ در نظر گرفته شد (نمودار ۱).

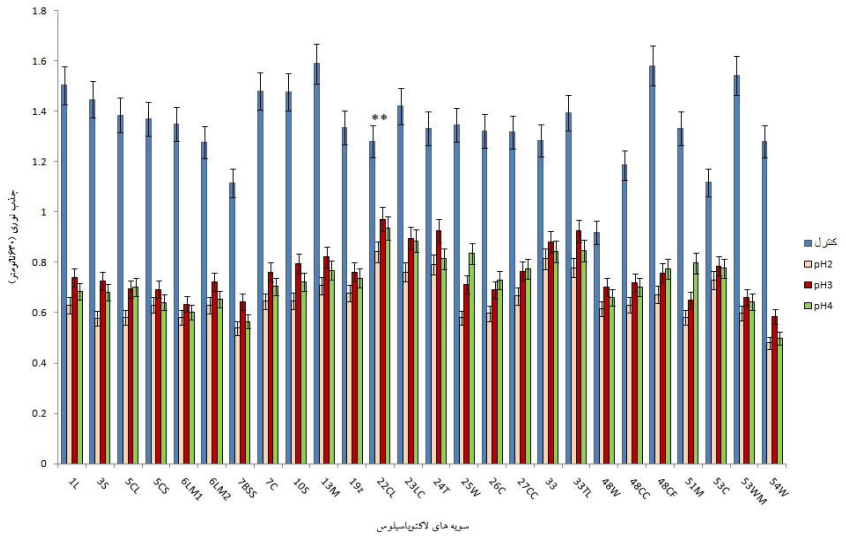
نتایج حاصل از اثر غلظت‌های ۰/۳٪، ۰/۵٪ و ۱٪ نمک‌های صفراوی بر روی رشد و بقاء لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده نشان دادند که رشد این سویه‌ها در حضور نمک‌های صفراوی نسبت به گروه شاهد، کاهش یافته است. ۸۴/۶۲٪ جدایه ها نسبت به کمترین غلظت نمک صفراوی (۰/۳٪) پس از هشت ساعت، از خود مقاومت نشان دادند. در بین جدایه ها، سویه‌های شماره ۲۲CL و ۵۳C در غلظت‌های ۰/۳، ۰/۵ و ۱ درصد صفرا، رشد بالایی نسبت به دیگر سویه‌ها نشان دادند (نمودار ۲).

مطالعه اثر آنتاگونیستی *لاکتوباسیلوس*های جداسازی شده بر روی باکتری‌های پاتوژن *لیستریا منوسیتوژنز* و *انتروکوکوس فکالیس* جدا شده از نمونه‌های بالینی و سویه‌های استاندارد *اشریشیا کلی PTCC 1330*، *استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112* و *باسیلوس سرئوس PTCC 1015*، با روش چاهک پلیت، انجام شد. قطر هاله‌های عدم رشد در سویه‌های مختلف بین ۵/۷ تا ۴۴/۰۲ میلی‌متر متغیر بود. بر اساس نتایج حاصله، بیشترین اثر مهاری جدایه ها بر *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیا کلی* PTCC 1330 و *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC 1112 بود. سویه‌های ۶۱LM، ۵۳C، ۲۳LC و ۴۸CC دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بودند (جدول ۲).

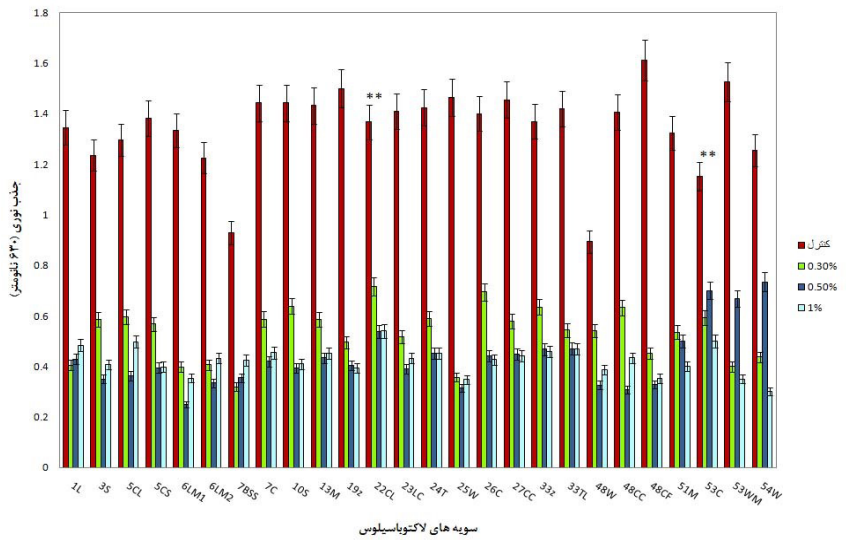
در بررسی تأثیر ضد میکروبی جدایه ها، *اشریشیا کلی* PTCC 1330 (۲۶/۹۲٪)، *انتروکوکوس فکالیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس*

www.SID.ir

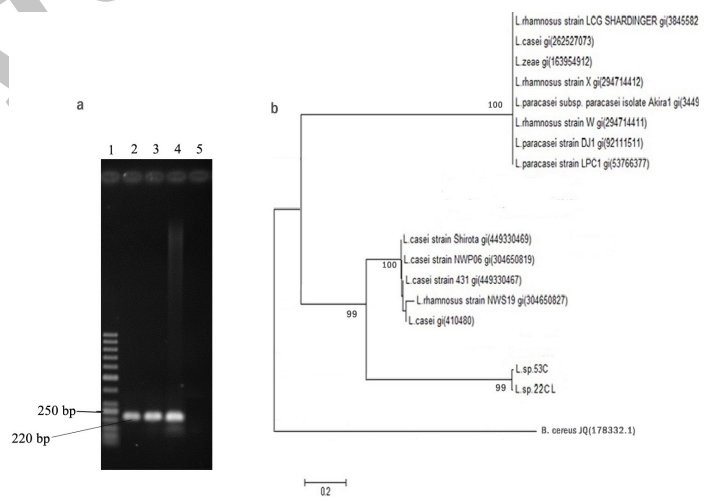
Archive of SID



نمودار ۱ : مقاومت جدایه های *لاکتوباسیلوس* نسبت به pH های ۲، ۳ و ۴. کنترل (pH ۶/۸). ** نشان دهنده توانایی بالای سویه ۲۲CL نسبت به بقیه جدایه ها در تحمل pH های اسیدی ۲، ۳ و ۴ می‌باشد.



نمودار ۲ : مقاومت سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از لبنیات در غلظت‌های ۰/۳٪، ۰/۵٪ و ۱٪ (وزنی/حجمی) نمک صفراوی (کنترل فاقد نمک صفراوی است). ** نشان دهنده توانایی بالای سویه‌های ۵۳C و ۲۲CL نسبت به بقیه جدایه ها در تحمل غلظت ۱٪ (وزنی/حجمی) نمک صفراوی می‌باشد.



نمودار ۳ :محصول PCR پرایمرهای اختصاصی لاکتوباسیلوس (LbLMA1 و R16-1)، چاهک های شماره ۱: مارکر bp ۵۰، ۲: سویه استاندارد Lactobacillus acidophilus ATCC 4356، ۳: سویه C ۵۳ ، ۴: سویهCL 22 ، ۵: کنترل منفی (a)؛ درخت فیلوژنی، نشان دهنده ارتباط بین توالی ژنrRNA 16S سویه‌های لاکتوباسیلوس ۵۳C و لاکتوباسیلوس ۲۲CL و توالی های مرجع در GeneBank، اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش bootstrap (۱۰۰٪) می‌باشد. از باکتری B. cereus JQ(178332.1) به‌عنوان outgroup استفاده شد (b).

www.SID.ir

جدول ۲ : بررسی فعالیت ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از لبنیات بومی کرمان بر اساس میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) با روش چاهک پلیت.

ردیف	جدایه ها	انتروکوکوس فکالیس*	لیستریا منوسیتوژنز*	استافیلوکوکوس اورئوس	اشریشیا کلی	باسیلوس سرئوس
۱	48CC	۱۳/۶	۱۸/۶۱	۱۱/۱۵	۱۳/۲۲	۳۲/۶
۲	48CF	۷/۶	۱۸/۹۴	۱۶/۶	۱۲/۸	۲۰/۳
۳	48W	۲۰/۲۲	۲۰/۳	۱۷/۴	۲۲/۹	۱۵/۸
۴	33	۲۳/۵	۱۹/۱۱	۲۳/۴	۲۰/۳	۱۸/۷
۵	26C	۱۱/۱۳	۱۵/۷	۲۲/۶۱	۱۵/۷	۱۸/۱۴
۶	23LC	۲۹/۶	۳۰/۳۱	۴۴/۰۲	۱۶/۱	۲۸/۵
۷	22CL	۲۸/۳۱	۲۸/۸	۲۵/۱۱	۲۶/۳۱	۲۲/۷
۸	13M	۲۶/۹	۲۴/۳۳	۳۳/۹	۱۷/۵	۲۶/۳۲
۹	10S	۲۲/۳	۱۹/۷۲	۱۹/۱۸	۳۳/۶	۲۳/۵۲
۱۰	7BSS	۲۸/۱۵	۲۹/۱۹	۲۴/۰۳	۲۳/۹	۲۹/۵
۱۱	6LM2	۲۷/۵	۲۰/۹۱	۳۰/۳	۲۳/۷	۲۳/۲۲
۱۲	6LM1	۴۰/۱	۲۸/۶	۲۲/۵	۳۷/۴	۲۷/۶
۱۳	5CS	۳۰/۹۲	۲۶/۲۴	۲۶/۴	۲۹/۸	۲۵/۳۱
۱۴	5CL	۲۶/۷۷	۲۱/۲	۲۲/۸۲	۲۵/۷۲	۲۴/۵
۱۵	3S	۳۲/۱۱	۲۹/۶	۲۷/۵	۲۸/۴۴	۲۷/۸
۱۶	1L	۳۸/۳	۱۹/۷۱	۲۶/۱	۳۵/۹	۲۵/۸
۱۷	25W	۲۷/۵	۲۰/۴۴	۲۵/۴	۳۲/۵	۲۲/۰۵
۱۸	22CL	۲۸/۶	۲۸/۴	۲۵/۰۱	۲۷/۴	۲۳/۳۳
۱۹	54W	۱۹/۹۲	۱۶/۱۲	۱۵/۴۲	۱۸/۱	۱۵/۹
۲۰	24T	۲۴/۱	۲۲/۷	۲۲/۹	۲۰/۵۲	۱۹/۴۲
۲۱	19	۲۸/۷	۲۰/۲۲	۲۳/۳	۲۵/۹۳	۵/۷
۲۲	7C	۲۹/۲	۲۳/۴۱	۳۰/۰۴	۳۶/۸	۲۴/۵۳
۲۳	51M	۲۵/۹	۱۵/۹	۲۸/۷	۱۵/۲	۱۳/۹۲
۲۴	53WM	۳۱/۴	۲۸/۵	۱۸/۸۲	۳۵/۲	۲۵/۵
۲۵	53C	۳۷/۰۳	۳۳/۵۲	۴۰/۳	۲۸/۹	۲۷/۷
۲۶	33TL	۲۸/۰۹	۲۵/۸	۳۰/۳۳	۳۰/۲۴	۲۰/۳

* سویه‌های تهیه شده از نمونه‌های بالینی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان

PTCC 1112 (۲۳/۰۸٪)، *لیستریا منوسیتوژنز* (۷/۶۹٪) و *باسیلوس سرئوس PTCC 1015* (۳/۸۵٪) بیشترین حساسیت را از خود نشان دادند (قطر هاله ایجاد شده بین ۳۰ تا ۴۰ میلی‌متر بود) ($p<0/05$).

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، مشاهده نمودیم که دو سویه ۵۳C و ۲۲CL علاوه بر این که از توان تحمل pH های اسیدی و نمک‌های صفراوی برخوردار بودند، اثر ضد میکروبی خوبی نیز بر باکتری‌های پاتوژن مورد آزمون داشتند؛ بنابراین توالی ژنوم 16S rRNA در این باکتری‌ها تعیین و درخت فیلوژنتیک آن‌ها ترسیم گردید. نتایج حاصل از PCR ژن 16S rRNA توسط پرایمرهای اختصاصی لاکتوباسیلوس

www.SID.ir

(LbLMA۱ و R۱۶-۱) بر روی ژل آگارز ۱٪، حضور یک باند با اندازه ۲۲۰ جفت باز را نشان می‌داد که ثابت می‌شود باکتری‌های جدا شده از لبنیات بومی متعلق به جنس لاکتوباسیلوس هستند (شکل ۳a). پس از تکثیر ژن 16S rRNA با پرایمرهای یونیورسال (U۸F و U۱۳۹۰R)، محصول PCR با اندازه قطعه ۱۴۰۰ جفت باز توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی گردید. تطابق توالی ژن 16S rRNA نشان داد که این دو سویه لاکتوباسیلوس (۵۳C و ۲۲CL) در گروه *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* قرار دارند که با تشابه ۹۹٪ در نزدیک‌ترین فاصله از *لاکتوباسیلوس کازئی* قرار دارند (شکل ۳b).

بحث

مقاومتهای دارویی سالانه هزینه هنگفتی بر جوامع تحمیل می‌کنند به‌طوری که شعار سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۱، «مقاومت به داروهای ضد میکروبی، یک تهدید جهانی» در نظر گرفته شد. در میان درمانهای جایگزین آنتی‌بیوتیک، استفاده از پروبیوتیک‌ها به دلیل اثرات سلامت بخشی که به غیر از کنترل برخی از عفونت‌ها دارند، بسیار مورد توجه است. علت مطرح بودن این باکتری‌ها اثرات مثبت آن‌ها در روند سلامتی افراد می‌باشد(۲۰). ممانعت از فعالیت پاتوژن‌ها توسط پروبیوتیک ها می‌تواند تأثیر مهمی در سلامتی فرد در مقابل عفونت با پاتوژن‌های شایع دستگاه گوارش باشد. در واقع امروزه پروبیوتیک ها به‌عنوان عوامل مدیریتی عفونت‌های روده‌ای شناخته شده‌اند که با مکانیسم‌های متعددي که اساساً شامل ترشح مواد ضد میکروبی و اثرات آنتاگونیستی با پاتوژن‌ها در اتصال به جایگاه‌ها و کلونیزاسیون در سطوح مخاطی روده و رقابت در کسب مواد غذایی، فعالیت می‌کنند. در این بین آن چه واضح است، تعدیل سیستم ایمنی و سودمندي مجموعه‌ی پروبیوتیک ها بر سلامتی میزبان است(۲۱).

قدرت بقاء لاکتوباسیلوس‌ها در pH های اسیدی و حضور نمک‌های صفراوی، بسیار مهم می‌باشد چرا که مصرف خوراکی پروبیوتیکها، میکروارگانیسم را با طیفی از استرس‌های دستگاه گوارش که در معده شدت میگیرند، روبرو میکند؛ بنابراین مقاومت به اسید معده و نمکهای صفراوی، عبور موفقیت آمیز پروبیوتیک از معده و استقرار آن در روده را تضمین می‌نماید. بقای باکتری در pH های اسیدی در شرایط آزمایشگاه تا حدود زیادی میتواند زنده ماندن باکتری را حین عبور از معده نشان دهد(۲۲).

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که pH های اسیدی (۲، ۳ و ۴)، رشد جدایه ها را به طور قابل توجهی کاهش داد ولی در بین جدایه ها، سویه‌های شماره ۲۲CL، ۲۴T، ۳۳Z، ۳۳TL و ۵۳C توانستند نسبت به سایر جدایه ها در تمامی سطوح pH، رشد بهتری داشته باشند ($p<$ ۰/۰۵).

در سال ۲۰۱۱، Sieladie و همکارانش توانستند از میان ۴۱ جدایه لاکتوباسیلوس، ۱۸ سویه مقاوم به pH ۲ را جداسازی نمایند (۱۸). بر اساس مطالعات Rushdy و Gomaa مشخص گردید که مقاومت به pH در لاکتوباسیلوس‌ها، به فعالیت پمپ H^+ATpase و ترکیبات غشاء باکتری بستگی دارد. از طرف دیگر به نوع باکتری، نوع محیط کشت و شرایط انکوباسیون نیز مربوط می‌باشد (۲۳).

در این تحقیق دریافتیم که سویه‌های ۲۲CL، ۲۶C، ۵۳C و ۴۸CC قادر به رشد در غلظت های ۰/۳، ۰/۵ و ۱ درصد نمک‌های صفراوی، بوده‌اند. رشد سایر جدایه‌ها با افزودن غلظت‌های مختلف صفرا نسبتاً کاهش یافته است، ولی برآورد درصد بقاء برای این سویه‌ها نشان داد که ۸۸ درصد جدایه‌ها بعد از ۸ ساعت در غلظت ۰/۳ صفرا زنده مانده‌اند. گزارش Sieladie و همکاران (۲۰۱۱) حاکی بر این است که لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از لبنیات، غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ نمک‌های صفراوی را به خوبی تحمل می‌نمایند(۱۸).

مطالعه اثر ضد میکروبی جدایه‌ها در این تحقیق نشان داد که ۹۶/۱۵٪ این سویه‌ها به خوبی رشد باکتری‌های پاتوژن، *لیستریا منوسیتوژنز* و *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیا کلی PTCC 1330*، *استافیلوکوکوس اورئوس PTCC 1112* و *باسیلوس سرئوس PTCC 1015* را مهار نمودند. محدوده قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط جدایه ها، از ۵/۷ تا ۴۴/۰۲ میلی‌متر بود. طبق گزارش Schillinger و Luck در سال ۱۹۸۹، در صورتی که قطر هاله عدم رشد در اطراف هر کلنی مولد هاله، بیشتر از ۶ میلیمتر باشد، مهار رشد صورت گرفته است (۲۴). بر این اساس اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد در این مطالعه، نشان داد که لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از شیر، رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *انتروکوکوس فکالیس* را به صورت معنی‌داری بیشتر از رشد *باسیلوس سرئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* را مهار نمودند ($p<$ ۰/۰۵). در مورد لاکتوباسیلوس‌های جداشده از ماست نیز اثر مهارکنندگی لاکتوباسیلوس‌ها بر *انتروکوکوس فکالیس* معنی‌دار بود ($p<$ ۰/۰۵). در صورتی که اختلاف میانگین قطر هاله‌های باکتریهای پاتوژن در حضور لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از پنیر معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد که نوع ماده غذایی بر گونه *لاکتوباسیلوس* فلور موجود در آن، تأثیرگذار است و در این نمونه‌ها، به دلیل همگن بودن سویه‌های *لاکتوباسیلوس*، اختلاف

Archive of SID
www.SID.ir

معنی‌داری در اثر ضد میکروبی این جدایه‌ها دیده نشد. نتایج به دست آمده از مطالعات متعدد انجام‌شده بر روی اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌های مختلف، تأییدی بر بررسی حاضر است. در پژوهش‌های kiani و همکاران (۱۳۸۵) مشخص گردید که لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از ماست‌های محلی استان گلستان بر طیف گسترده‌ای از باکتری‌های پاتوژن اثر داشته‌اند (۱۲). Salehi (۱۳۹۱) نشان داد که لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از مواد غذایی بومی به خوبی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* را مهار نمودند (۱۳). مطالعات Yousefi و همکاران (۱۳۹۱) مشخص نمود لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از پنیرهای کوزه، اثر ضدمیکروبی خوبی بر باکتری‌های *لیستریا منوسیتوژنز* و *میکروکوکوس لوتئوس* داشته اند (۱۱). Datta و همکارانش در سال ۲۰۱۳، اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر گونه‌های *استافیلوکوکوس* را ثابت نمودند (۲۵). در سال ۲۰۰۱، Strus و همکارانش خاصیت ضد پاتوژنی سویه‌های لاکتوباسیلوس را علیه پاتوژن‌های بی‌هوازی دستگاه گوارش بررسی کرده و تأثیر مثبت آن‌ها را بر ضد این پاتوژن‌ها اثبات کردند (۲۶). Reid و همکارانش در مطالعه‌ای که برای اثبات ممانعت لاکتوباسیلوس‌ها از ابتلا به عفونت‌های روده‌ای ناشی از پاتوژن‌ها انجام دادند، نشان دادند که پروبیوتیک‌ها علیه پاتوژن‌های روده‌ای تأثیر مثبت دارند (۲۷). همچنین فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس* به وسیله Ogunbanw و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق، آن‌ها نشان دادند که این لاکتوباسیلوس‌ها قادرند رشد *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کلی* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* را به خوبی مهار نمایند(۲۸).

براساس آنالیز فیلوژنتیک بر پایه توالی یابی ژن 16S rRNA، مشخص گردید که دو سویه برتر جداسازی شده از لبنیات بومی کرمان متعلق به گونه *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌باشند.

با توجه به نتایج حاصله مربوط به توان تحمل شرایط اسیدی و غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی دو سویه *لاکتوباسیلوس* ۵۳C و ۲۲CL و همچنین داشتن اثر ضدمیکروبی قابل توجه بر باکتری‌های پاتوژن به خصوص انتروکوکوس فکالیس و *لیستریا منوسیتوژنز* در شرایط *In vitro*، به نظر می‌رسد که این سویه‌ها کاندیدی مناسب برای مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا باشند که البته بهتر است اثرات ضدمیکروبی این دو سویه در شرایط *In vivo* نیز مورد مطالعه قرار گیرند و مشخص گردد که آیا واقعاً این دو سویه در شرایط موجود در دستگاه گوارش موجودات زنده نیز به همان اندازه شرایط آزمایشگاهی، از توان ضد میکروبی خوبی برخوردار است. از طرف دیگر بهتر است قدرت اتصال و پتانسیل رشد و بقاء این سویه‌ها در دستگاه گوارش موجودات زنده نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه شهید باهنر کرمان به دلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌گردد. مقاله حاضر حاصل پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد در بهمن‌ماه ۱۳۹۲ می‌باشد و در بین نویسندگان هیچ تعارض منافعی وجود ندارد.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1- De Roos N, Katan M. 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.

2- Park YH, Kim JG, Shin YW, Kim HS. Effects of Lactobacillus acidophilus 43121 and a mixture of Lactobacillus casei and Bifidobacterium longum on the serum cholesterol level and fecal sterol excretion in hypercholesteroemia-induced pigs. Biosci Biotech Biochem 2008; 72 (2): 595-600.

3- Resta-Lenert S, Barrett K. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). Gut 2003; 52 (7): 988-997.

4- Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited Review: The scientific basis of Lactobacillus acidophilus NCFM functionality as a probiotic. J Dairy Sci 2001; 84 (2): 319-33.

5- O'Toole PW, Cooney JC. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. Interdiscip Perspect Infect Dis 2008; 2008: 1-9.

Archive of SID

www.SID.ir

6- Klaenhammer TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. FEMS Microbiol Rev 2005; 29 (3): 393-409.

7- Klein G, Pack A, Bonaparte C, Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 1998; 41 (2): 103-125.

8- Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria- a review. Int J Food Microbiol 2005; 105 (3): 281-295.

9- Klaenhammer TR, Kleeman EG. Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of Lactobacillus acidophilus. Appl Environ Microbiol 1981; 41 (6): 1461-1467.

10- Soccol RC, de Souza Vandenberghe LP, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, De Dea Lindner L, et al . The Potential of Probiotics. Food Technol Biotech 2010; 48 (4): 413-434.

11- Yousefi M, Zadbari MR, Alizadeh Khaled Abad M, Khashi R. Antagonistic effect of antibacteria compounds produced from isolated Lactobacilli strains from urn cheeses of west Azarbaijan. Res Food Industry 2012; 22 (2): 123-130. [In Persian]

12- Kiai E, Mozafari NA, Samioladab H, Jandaghi N, Ghaemi E. Antagonistic effect of Lactic acid bacteria isolated from yogurt against pathogen bacteria. J Gorgan Univ Med Sci 2006; 8 (1): 28-33. [In Persian]

13- Salehi M. Assessment antagonistic effect of Lactobacilli isolated from Iranian traditional food. J Innov Food Sci technol 2013; 5 (1): 79-84. [In Persian]

14- Arab Soleimani N, Kermanshahi R, Yakhchali B, Nejad Sattar T. Antagonistic activity of probiotic Lactobacilli against Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. Afr J Microbiol Res 2010; 4 (20): 2167-2173.

15- Dinkci N. The influence of transglutaminase treatment on functional properties of strained youghrt. J Anim Vet Adv 2012; 11 (13): 2238-2246.

16- Yantyati Widyastuti1, Rohmatussolihat1, Andi Febrisiantosa. The role of Lactic acid bacteria in milk fermentation. Food Nutr Sci 2014; 5: 435-442.

17- Ludwig W, Schileifer KH and Whitman WB. Lactobacillales ord. nov. In: Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH and Whitman WB, editors. 2nd ed. USA: Springer; 2009. p.464-511.

18- Sieladie DV, Kaktcham PM, Cresci A, Fonteh F. Probiotic properties of Lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. Innov Roman Food Biotech 2011; 9 (9): 12-28.

19- Dubernet S, Desmasures N, Gueguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiol Let 2002; 214 (2): 271-275.

20- Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada: 2002. April, May. Guidelines for evaluation of probiotics in food.

21- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. Food Res Inter 2007; 40 (5): 629-636.

22- Corzo CG, Gilliland SE. Bile salt hydrolase activity of three strains of Lactobacillus acidophilus. J Dairy Sci 1999; 82 (3): 472-480.

23- Rushdy AA, Gomaa ER. Antimicrobial compounds produced by probiotic Lactobacillus brevis isolated from dairy products. Annal Microbiol 2013; 63 (1): 81-90.

24- Schillinger U, Luck FK. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Appl Environ Microbiol 1989; 55 (8):1901-1906.

25- Datta S, Nama KS, Paras P, SHarma P, Shaikh N, Nagar J. Antagonistic activity of Lactic acid bacteria from dairy products. Indian J Pure Ap Bio 2013; 1: 1-5.

26- Strus M, Gosciniak H. Antagonistic activity of Lactobacillus bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (Helicobacter pylori, Campilo-

Archive of SID
www.SID.ir

bacter coli, Campilobacter jejuni, Clostridium difficile). Med Doświadczalna i Mikrobiologia 2001; 53 (2): 133-142.

27- Reid G, Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microb Infect 2002; 4 (3): 319-324.

28- Ogunbanwo ST, Sanni A, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OGI. Afr J Biotechnol 2003; 2 (8): 219-227.

Archive of SID

www.SID.ir