Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

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

Elham Hossein Alipour[1], Karim Mardani[2], Mehran Moradi[2]

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

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

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 monocytogenesis*, *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

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۲ – خرداد-تیر ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* از شیر گاومیش و ارزیابی اثرات ضدمیکروبی آن

الهام حسین علیپور[۱]، کریم مردانی[۲]، مهران مرادی[۲]

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

۲. گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

اطلاعات مقاله

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 موادغذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۲۶۳۳

پست الکترونیک:

m.moradi@urmia.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: *لاکتوباسیلوس سالیواریوس، باکتری پروبیوتیک شناخته‌شده‌ای 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 ضدمیکروبی آن در شرایط آزمایشگاهی است.*

مواد و روش‌کار: 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 به‌منظور تعیین گونهٔ آنها از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و به‌دنبال آن چندشکلی طولی قطعهٔ محدودشونده (PCR-RFLP) و تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA* استفاده شد. اثرات ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و مایع رویی آن بر علیه *لیستریا منوسیتوژنز، سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌ترتیب به روش نقطه‌ای و دیسک بررسی شد. همچنین هیدروفوبیسیتی سطحی باکتری به روش اتصال باکتری به هیدروکربن گزیلن و تولئن ارزیابی شد.

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

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که شیوع جنس *لاکتوباسیلوس* در شیر گاومیش بسیار پایین است و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جداشده از خصوصیات ضدمیکروبی منحصربه‌فردی در مقایسه با باکتری *پروبیوتیک* استاندارد برخوردار است.

کلمات کلیدی: گاومیش، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*، قدرت ضدمیکروب، هیدروفوبیستی، تشخیص مولکولی، شیر

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

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک، فلور طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوانات به‌شمار می‌روند. در بسیاری از اکوسیستم‌های غذایی این باکتری‌ها بخش اعظمی از میکروفلور غالب را تشکیل می‌دهند و ممکن است به‌صورت کشت کمکی و یا استارتر به محصولات غذایی نیز اضافه شوند. همچنین باکتری‌های اسیدلاکتیک علیه عوامل مختلف بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا، طیف وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی را تولید می‌کنند و لذا این قابلیت را دارند که برای مقابله با این نوع از عوامل میکروبی استفاده شوند (۲،۱). در شرایط خاصی، بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید 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 اسیدلاکتیک از سوی این باکتری‌ها و در نتیجه کاهش pH محیط از جمله عواملی است که منجر به عملکرد ضدمیکروبی آن‌ها می‌شود. همچنین تولید ترکیبات ضدمیکروبی متنوع که در دو دسته ترکیبات با وزن مولکولی پایین (پراکسید هیدروژن، دی‌اکسیدکربن و دی‌استیل) و وزن مولکولی بالا (نظیر باکتریوسین‌ها) قرار می‌گیرند، از ویژگی‌های بارز این باکتری‌ها

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

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

*لاکتوباسیلوس*ها، باکتری‌های گرم مثبت میله‌ای شکل متعلق به باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند. این جنس بیشترین تنوع بین‌گونه‌ای را دارند و بالغ بر ۱۵۲ گونهٔ 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. لاکتوباسلوس‌ها نقش مهمی در تولید محصولات تخمیری سبزی، گوشت و محصولات لبنی دارند (۵). در محصولات لبنی و دیگر محصولات تخمیری، *لاکتوباسیلوس*ها مسئول برخی ویژگی‌ها از جمله تولید اسیدلاکتیک، کاهش میزان لاکتوز، بهبود خصوصیات حسی، فیزیکی و شیمیایی و کنترل عوامل بیماری‌زا هستند. لذا از گونه-های 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*، به‌دلیل خصوصیات ویژه، به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک مطرح است. از ویژگی‌های پروبیوتیک این باکتری می-توان به ایجاد تعادل میکروبی در روده، تولید ترکیبات ضدمیکروب، تحریک سیستم ایمنی، مهار فعالیت آنزیمی مدفوع، تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر اشاره کرد. این باکتری به‌دلیل تولید باکتریوسین‌های زیر کلاس IIa, IIb, IId 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 عمل‌آوری‌شدهٔ خوک (۱۰) و مدفوع مرغ (۱۱ ، ۱۲) انجام شده است که نتیجهٔ این تحقیقات جداسازی سویه‌های مختلف با ویژگی‌های عملکردی متفاوت است. در برخی نمونه‌ها از جمله *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*CECT جداشده از مدفوع نوزاد شیرخوار (۸)، باکتری به‌عنوان پروبیوتیک شناخته‌شده 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 برخوردار است (۱۳). تاکنون از منابع مختلف برای جداسازی، شناسایی و عرضهٔ جدایه‌های جدید با خصوصیات عملکردی مناسب استفاده شده که نتیجهٔ 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 گاومیش که تولید و مصرف آن محدودهٔ 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 دربارهٔ ویژگی‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در محصولات لبنی شیر گاومیش (۱۵، ۱۴، ۶) مطالعهٔ جامعی در زمینهٔ تنوع، گونه‌های غالب و حضور باکتری *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* در شیر گاومیش صورت نپذیرفته است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی فنوتیپی و مولکولی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* از شیر خام گاومیش و ارزیابی برخی اثرات پروبیوتیکی آن از جمله اثرات ضدمیکروبی و باکتریوسینوژنیک بر علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیا کلی، لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس اورئوس* و هیدروفوبیسیتی سطحی باکتری در شرایط آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری شیر خام گاومیش و شناسایی فنوتیپی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس*

تعداد ۲۰ نمونه شیر خام گاومیش 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 موادغذایی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. برای جداسازی اولیه، ابتدا یک میلی‌لیتر از هر نمونه شیر، به ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS براث (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 به‌مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس از هر نوع نمونه با آنس روی محیط MRS آگار کشت خطی داده و پلیت‌ها در دمای ۳۷°C به‌مدت ۴۸ـ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. پس از آن حداکثر تعداد ۵ کلنی تکی متفاوت به‌صورت تصادفی از هر نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

انتخاب شد و ابتدا تست کاتالاز و سپس رنگ‌آمیزی گرم و بررسی شکل با استفاده از میکروسکوپ نوری انجام پذیرفت (۱۶). کلنی-هایی که به شکل گرد و محدب با لبهٔ 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 انتخاب‌شده با استفاده از روش توصیف‌شده از سوی Aljanabi و Martinez (۱۹۹۷) استخراج شد (۱۷). قطعه‌ای از ژن *16S rRNA* به‌اندازهٔ ۱۵۴۰ جفت باز با استفاده از جفت پرایمر توصیف‌شده از سوی Scarpellini و همکاران (۲۰۰۲) شامل پرایمر رفت (EGE1) و برگشت (EGE2) به‌ترتیب با توالی‌های '5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 و '5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3 به‌روش PCR تکثیر شد (۱۸). 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 استخراج‌شده، انجام گرفت. واکنش PCR با استفاده از ترموسایکلر QB96 (Quanta Biotech, UK) با برنامهٔ دمایی عرضه‌شده از سوی Scarpellini و همکاران انجام گرفت (۱۸). در ادامه قطعهٔ تکثیرشده با استفاده از آنزیم *HinfI* هضم آنزیمی شد و به‌منظور شناسایی گونه، الگوی هضم آنزیمی محصول PCR جدایه‌های مختلف با الگوی هضم آنزیمی جدایه-های گزارش‌شده 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.

ارزیابی ویژگی‌های ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*

تهیه و آماده‌سازی باکتری‌ها

در این مطالعه، باکتری‌های *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC1730، *اشریشیا کلی* ATCC 11303، *لیستریا مونوسیتوژنز* ATCC 19115، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 25923 به‌عنوان عوامل بیماری‌زا و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 به‌عنوان کنترل استفاده شدند. این باکتری‌ها از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت موادغذایی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شدند. برای نگهداری باکتری‌ها در دمای ۱۸°C- و تهیهٔ سوسپانسیون آنها از محیط کشت لوریا برتانی و MRS استفاده شد. برای به‌دست آوردن تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر، از روش تعیین جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیلهٔ اسپکتوفتومتر و کشت باکتری استفاده شد.

بررسی فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*

ویژگی‌های ضدمیکروبی *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 به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C نگهداری شدند. سپس ۷ میلی‌لیتر محیط لوریا برتانی نیمه‌جامد حاوی تعداد استاندارد (۱/۵×۱۰^{۶} باکتری در هر میلی‌لیتر) از هریک از باکتری‌های بیماری‌زای بررسی‌شده (*لیستریا مونوسیتوژنز*، *سالمونلاتیفی موریوم*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*) در فاز ایستایی به‌صورت لایهٔ دوم به پلیت اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، ناحیهٔ مهاری تشکیل‌شده بررسی و با کولیس اندازه‌گیری شد. در این آزمایش از باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 به‌عنوان نمونهٔ شاهد برای مقایسه با *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* استفاده شد.

بررسی تولید باکتریوسین *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*

پس از تأیید خواص ضدمیکروبی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*، برای تهیهٔ مایع رویی حاصل از کشت باکتری (Cell free supernatant)، در محیط MRS برای باکتری کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵°C در انکوباتور شیکردار از آن نگهداری به‌عمل آمد. سپس سوسپانسیون باکتریایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲°C با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. برای از بین بردن اثر اسیدلاکتیک و پراکسید هیدروژن احتمالی تولیدشده از سوی باکتری، به‌ترتیب pH مایع رویی به‌دست‌آمده 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 به‌مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند و پس از خشک‌شدن در دمای ۳۷°C، روی سطح پلیت کشت‌داده‌شده با باکتری‌های بیماری‌زای منتخب قرار گرفتند. پس از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

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

سنجش هیدروفوبیستی باکتری

برای سنجش هیدروفوبیستی سطحی باکتری، از آزمون اتصال باکتری به هیدروکربن گزیلن و تولئن استفاده شد. ابتدا سوسپانسیون باکتریایی با جذب نوری ۰/۰۸ 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 به‌مدت دو دقیقه، سوسپانسیون به‌مدت 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 سلول‌های متصل به هیدروکربن با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد. در این آزمایش باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 به‌عنوان نمونهٔ شاهد برای مقایسه با *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بررسی شد (۲۱).

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

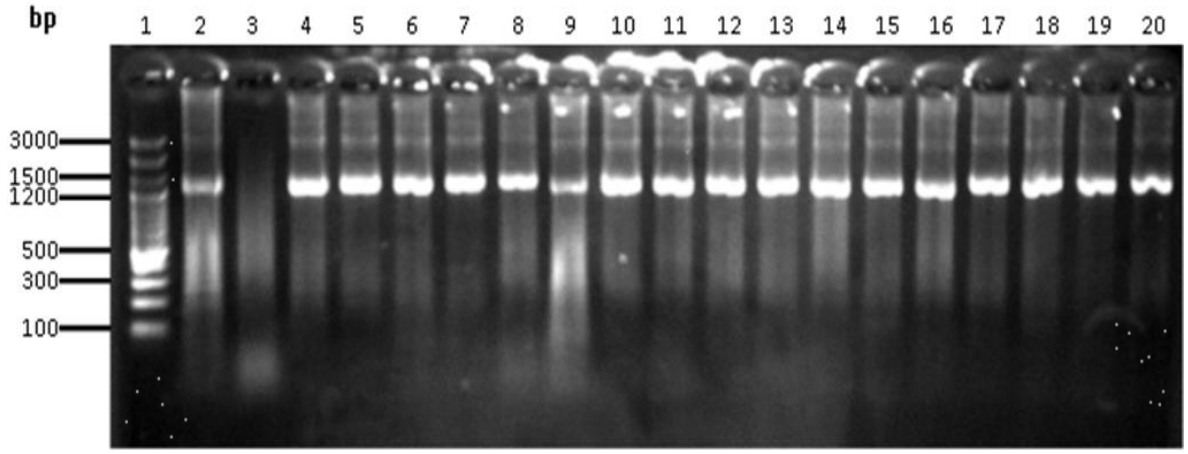
روش آماری

داده‌های به‌دست‌آمده در این تحقیق با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست تعقیبی دانکن در برنامهٔ SPSS نسخهٔ ۲۲ (IBM corp., NY, USA) در سطح معنی‌دار $P < ۰/۰۵$ آنالیز شدند. برای رسم منحنی از نرم‌افزار GraphPad (San Diego California USA) استفاده شد. تمامی تست‌های میکروبی و هیدروفوبیسیتی حداقل در سه تکرار انجام گرفتند.

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 به‌طول حدود ۱۵۴۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۱) که به‌عنوان جنس *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند. ۲۳ *لاکتوباسیلوس* شناسایی‌شده برای شناسایی گونه، تحت ارزیابی‌های مولکولی شامل هضم آنزیمی و تعیین توالی نوکلئوتیدی قرار گرفتند. با استفاده از آنزیم *HinfI* قطعات تکثیرشده برش داده شدند. الگوهای هضم آنزیمی متفاوتی برای جدایه‌های مختلف به‌دست آمد (شکل۲). به‌طور کلی از تعداد ۲۳ جدایهٔ بررسی‌شده به روش هضم آنزیمی، ۸ الگوی هضم آنزیمی متفاوت که تحت‌عنوان الگوهای P1 الی P8 نامگذاری شدند، به‌دست آمد (شکل A ۲ و B ۲). 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 جدایه‌های *لاکتوباسیلوس*، یک جدایه مربوط به *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* گزارش شد.

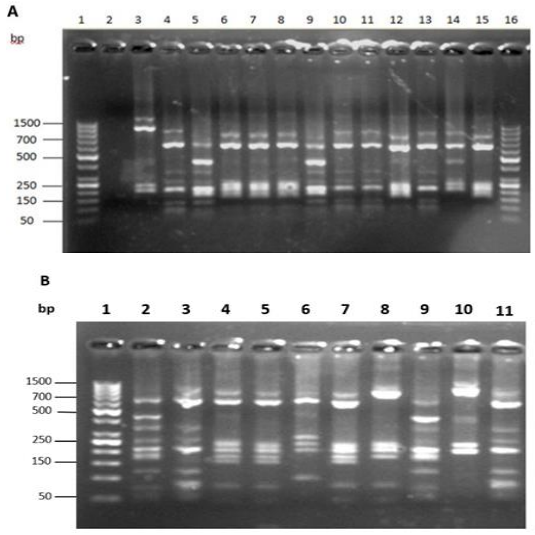


شکل ۱. محصولات PCR به‌اندازهٔ ۱۵۴۰ جفت باز حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA* تعدادی از جدایه‌های باکتریایی (باسیل‌ها و کوکسی‌ها) بارگذاری‌شده روی ژل اگارز ۱/۵ درصد. چاهک ۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰bp (سینا کلون، ایران)، چاهک ۲: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (کنترل مثبت)، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک‌های ۲۰-۴: محصولات PCR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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

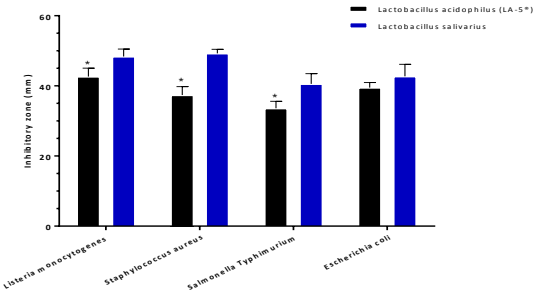


شکل ۲. الگوی هضم آنزیمی محصولات PCR ناحیهٔ ژنومی *16S rRNA*، ۲۳ جدایهٔ *لاکتوباسیلوس* تأیید شده که با استفاده از آنزیم *HinfI* انجام گرفته است (بارگذاری‌شده روی ژل آگارز ۱/۵ درصد). A: چاهک‌های ۱ و ۱۶: مارکر مولکولی bp ۵۰ (سینا کلون، ایران)، چاهک ۳: الگوی P1، چاهک‌های ۴، ۱۰، ۱۱ و ۱۳: الگوی P2، چاهک ۵: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

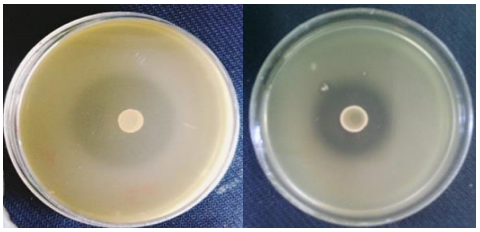
فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*

توانایی مهار رشد جدایهٔ *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA5 روی باکتری‌های بیماری‌زا که به‌صورت هالهٔ ممانعت از رشد بیان می‌شود، در شکل ۳ آورده شده است. نتایج آزمون ضدمیکروبی نشان داد که *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* اثر مهاری روی باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد و به‌ترتیب هالهٔ ممانعت از رشدی به قطر ۴۸/۳۷، ۴۲/۷۲، ۴۰/۵۵ و ۴۹/۲۷ میلی‌متر ایجاد کرد که اختلاف معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) با باکتری استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5 داشت.

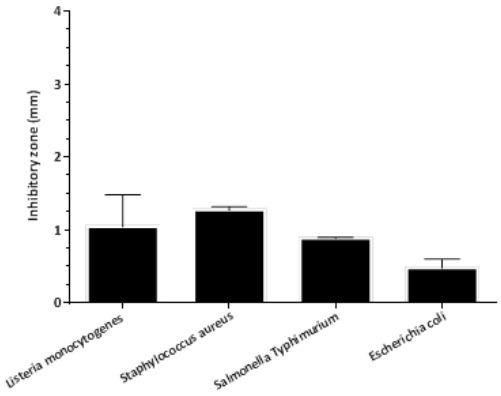
اثرات مهاری مایع رویی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* روی باکتری‌های بیماری‌زا که به‌صورت هالهٔ ممانعت از رشد است (شکل۴)، در شکل ۵ آورده شده است.



شکل۳. قطر هالهٔ رشدنیافتگی باکتری‌های بیماری‌زای بررسی‌شده بر حسب میلی‌متر در مواجهه با *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5 (کنترل) نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) بین گروه تیمار و گروه کنترل است.



شکل۴. هالهٔ ممانعت از رشد مایع رویی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* علیه باکتری گرم منفی (*اشریشیا کلی*) (سمت راست). باکتری گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس*) (سمت چپ).



شکل۵. قطر هالهٔ رشدنیافتگی باکتری‌های بیماری‌زا بر حسب میلی‌متر در مواجهه با مایع رویی *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*

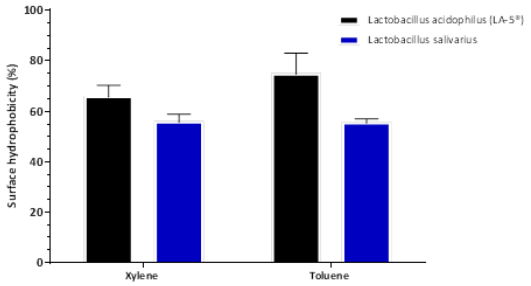
هیدروفوبیستی لاکتوباسیلوس سالیواریوس

هیدروفوبیستی سطحی لاکتوباسیلوس سالیواریوس با استفاده از اتصال به گزیلن و تولئن در شکل ۶ آورده شده است. هیدروفوبیستی لاکتوباسیلوس سالیواریوس به گزیلین و تولئین به‌ترتیب ۵۵/۶ و ۵۵/۳ درصد گزارش شد که حاکی از هیدروفوبیستی متوسط و مناسب جدایه بود.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018



شکل۶. درصد هیدروفوبیستی سطحی لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 (نمونهٔ کنترل) با استفاده از گزیلن و تولئن.

بحث و نتیجه‌گیری

باتوجه به اینکه جزئیات کاملی در زمینهٔ جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از شیر خام گاومیش وجود ندارد، بنابراین مطالعات و بررسی برای شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک از شیرخام گاومیش انجام شد. مرحلهٔ اول بررسی فنوتیپ باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از روش‌های کلاسیک و مرحلهٔ دوم استفاده از روش‌های مولکولی بود. در هر مرحله مشخص شد که تعداد جدایه‌های کوکسی 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 عرضه‌شده 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 هلوتیکوس*، به‌عنوان 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 پلانتاروم* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* هستند (۲۳). در مطالعهٔ Messaoudi و همکاران (۲۰۱۱)، به‌منظور جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از مدفوع مرغ، اکثریت جدایه‌ها متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* بود. *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*، ۱۹/۴درصد کل باسیلوس‌های جداشده را به خود اختصاص داد. سه سویهٔ مختلف *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* (SMXD51, MMS122, MMS151) اثرات ضدمیکروب چشمگیری بر *کمپیلوباکتر ژژونی* و *کمپیلوباکتر کلی* داشت. این ویژگی به‌دلیل تولید باکتریسوین از سوی این سویه‌ها گزارش شد (۱۲).

نتایج بررسی Aziz و همکاران (۲۰۰۹) روی باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر گاو نشان داد که از مجموع ۲۷ جدایهٔ رشدیافته در محیط MRS، با استفاده از شناسایی بیوشیمیایی، فقط ۵ باکتری اسیدلاکتیک شامل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* تحت گونهٔ *بولگاریکوس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونهٔ *کرموریس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونهٔ *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 به‌ترتیب *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* تحت گونهٔ لاکتیس، گونه‌های غالب بودند (۱۴). مطالعات این محققان نشان داد که به‌دلیل تنوع بالای باکتری‌های اسیدلاکتیک در شیر گاومیش، باکتری اسیدلاکتیک شیر این حیوان، مناسب برای استفاده به‌عنوان استارتر در کره است. در این مطالعه خصوصیات عملکردی و تکنولوژیک جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک بررسی نشد (۱۴). بررسی‌های مولکولی در مطالعهٔ حاضر نشان داد از تعداد کل باکتری‌های اسیدلاکتیک کوکوسی، حدود ۹۷ درصد *انتروکوکوس فاسیوم* و حدود ۳ درصد *انتروکوکوس کازئیفلاووس* 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 ضدمیکروبی مناسبی روی باکتری‌های بیماری‌زای مطالعه‌شده نشان داد و روند بقای ایده‌آل در شرایط دستگاه گوارشی را نیز از خود نشان داد. نتایج این مطالعه مشخص کرد که علت خاصیت ضدمیکروبی این جدایه به‌دلیل تولید لاکتات، استات و پراکسید هیدروژن است (۸).

توانایی در مهار رشد باکتری‌های فسادزا و بیماری‌زا از مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌شمار می‌رود و به‌عنوان 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 به‌عنوان 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* جداشده در این مطالعه اثرات ضدمیکروبی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

منحصربه‌فردی دارد؛ به‌طوری که در مقایسه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LA-5، اثرات ضدمیکروبی معنی‌داری نشان داد. بیشترین اثر ضدمیکروبی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* به‌ترتیب در *استافیلوکوکوس آرئوس* (۴۹/۲۷ میلی‌متر)، *لیستریامنوسیتوژنز* (۴۸/۳۷ میلی‌متر) *اشریشیاکلی* (۴۲/۷۲ میلی-متر) و *سالمونلاتیفی‌موریوم* (۴۰/۵۵ میلی‌متر) دیده شد. این اثرات دربارهٔ *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به‌ترتیب 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 جدایهٔ *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* نشان دادند. در مطالعهٔ Iranmanesh و همکاران (۲۰۱۲) پیرامون ویژگی‌های ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از شیر و ماست، نشان داده شد که از مجموع ۱۶۸ جدایهٔ جداشده از محیط MRS، فقط ۷۷ درصد جزو باکتری‌های اسیدلاکتیک بودند و از این تعداد ۳۳ جدایه خواص ضدمیکروبی بر علیه برخی عوامل بیماری‌زا از جمله *لیستریا منوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس آرئوس* و *سالمونلا انترتیدیس* داشتند (۲۵).

Karami و همکاران (۲۰۱۷) اثرات ضدمیکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* جداشده از نمونه‌های لبنی شامل شیر گاو، شیر گاومیش، پنیر و ماست علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* را بررسی کردند. نتایج نشان داد سه جدایهٔ *لاکتوباسیلوس آلیمانتاریوس*، *لاکتوباسیلوس ساکای* و *لاکتوباسیلوس کلونوایدس* اثرات ضدمیکروبی متوسط (هالهٔ ممانعت کمتر از ۱۵ میلی‌متر) و قوی (هالهٔ ممانعت از رشد بالای ۱۵ میلی‌متر) داشتند (۲۶). Mercan و همکاران (۲۰۱۵) اثرات ضدمیکروبی ۴ جدایهٔ *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جداشده از مدفوع مرغ را بر علیه باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس*) و منفی (*اشریشیاکلی*، *سالمونلا تیفی‌موریوم* و *یرسینیا انتروکولیتیکا*) بررسی کردند. نتایج مطالعهٔ 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 ضدمیکروبی مشاهده‌شده را به تولید باکتریوسین و ترکیبات شبه باکتریوسین نسبت دادند (۱۱). در مطالعه‌ای تنوع باکتری‌های اسیدلاکتیک دانه کفیر استفاده‌شده در کشور برزیل با هدف جداسازی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس* با خصوصیت پروبیوتیک انجام پذیرفت. ۱۰۸ جدایهٔ جداشده به روش مولکولی و برش DNA ریبوزومی و سکانس ژن *16S rRNA* تعیین گونه شدند که در مجموع در ۱۱ جنس شامل لاکتوکوکوس، لوکونستوک، *لاکتوباسیلوس* و اُانکوکوس قرار گرفتند. در ۵۲ جدایهٔ *لاکتوباسیلوس* تست مقاومت به اسید معده، نمک‌های صفراوی، بررسی خصوصیات ضدمیکروبی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک انجام پذیرفت که نتایج وجود ویژگی پروبیوتیکی مناسب در سه گونه را نشان داد (۲۷).

مطالعات مختلفی دربارهٔ بررسی ویژگی‌های ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک مربوط به تولید ترکیبات شبه باکتریوسین است. باکتریوسین‌ها، پپتیدهای سنتزشده از سوی ریبوزوم‌ها هستند که از قدرت ضدمیکروبی بالایی برخوردارند. طیف وسیعی از باکتری‌ها از جمله باکتری‌های اسیدلاکتیک قادر به تولید آنها هستند (۲). در این مطالعه برای اینکه مشخص شود خصوصیات ضدمیکروبی باکتری مربوط به کدام ترکیب باکتری است، مایع رویی باکتری تهیه و سپس به‌ترتیب 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 ضدمیکروب موجود در مایع رویی، ترکیبات شبه باکتریوسین تصور می‌شود. نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که بخشی از اثرات ضدمیکروبی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس* مربوط به ترکیبات شبه باکتریوسین است، چرا که مایع رویی تمیارشده با سود و کاتالاز، اثرات ضدمیکروبی نشان داد. بیشترین اثر ضدمیکروبی پالیده بر علیه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرئوس* با قطر هاله ممانعت از رشد ۱/۳ میلی‌متر بود و کمترین اثر ضدمیکروب هم مربوط به باکتری *اشریشیا کلی* (قطر هاله ممانعت ۰/۵ میلی‌متر) می‌شد.

به‌طور کلی، فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌ها علیه میکروارگانیسمی است که ارتباط نزدیکی با میکروارگانیسم تولیدکنندهٔ آن دارد. در بررسی انجام‌شده روی ۵۴ نمونه شیر در ایران، ۱۹۸ جدایهٔ مختلف باکتری اسیدلاکتیک به روش فنوتیپی جداسازی و شناسایی شد. همهٔ جدایه‌ها تقریباً اثر ضدمیکروبی بر علیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس آرئوس* نشان دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این خاصیت ضدمیکروبی بیشتر مربوط به تولید اسید آلی از سوی این باکتری‌ها است و پراکسید هیدرون نقشی ندارد. همچنین ثابت شد که اثر ضدمیکروبی ۴ جدایهٔ تحت مطالعه روی *استافیلوکوکوس آرئوس* مرتبط با تولید مواد مهاری شبه باکتریوسین است (۲۸). Marques و همکاران (۲۰۱۷) اثرات

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

مواد شبه باکتریوسین *لاکتوباسیلوس کورواتوس* P99 را بر *لیستریا منوسیتوژنز* 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 منوسیتوژنز* در پنیر شد (۴).

یکی از معیارهای باکتری‌های پروبیوتیک، مرتبط با توانایی باکترسی 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 گزیلین 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 دربارهٔ هیدروفوبیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده در حضور گزیلن، 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 مطالعهٔ حاضر نشان داد که هیدروفوبیسیتی سطحی جدایهٔ *لاکتوباسیلوس*، اختلاف معنی‌داری با باکتری استاندارد ندارد.

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 گاومیش بسیار پایین است و به‌نظر می‌رسد، دیگر جنس‌ها از فراوانی بیشتری در این شیر برخوردار باشند. *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جداشده از شیر گاومیش در این مطالعه اثرات ضدمیکروبی 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 جدایهٔ فعلی به‌عنوان یک پروبیوتیک جدید در صنایع مختلف از جمله صنایع لبنی استفاده کرد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از همکاران محترم آزمایشگاه میکروب‌شناسی موادغذایی و آزمایشگاه مرکزی دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌خاطر همکاری در اجرای این پژوهش کمال امتنان را به‌عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. 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

2. 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 PMCID:PMC3488010

3. 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

4. Marques JdL, Funck GD, Dannenberg GdS, Cruxen CEDS, Halal SLME, Dias ARG, et al. Bacteriocin-like substances of L*actobacillus 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

5. 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

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

6. Jeronymo-Ceneviva A, de Paula A, Silva L, Todorov S, Franco BM, Penna A. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffalo 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, Jiang 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, Mojgani 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

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

www.SID.ir

Archive of SID

Bioeng. 2014;118(2):153-9. https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.01.015 PMID: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 PMCID:PMC5680649

27. Zanirati DF, Abatemarco Jr M, Sandes SHdC, Nicoli JR, Nunes ÁC, 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

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.

Downloaded from ijmm.ir at 12:11 +0430 on Saturday September 8th 2018

www.SID.ir