جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی از محصولات لبنی سنتی کلیبر، هریس و ورزقان

طاهره نریمانی[۱]، علیرضا تاری‌نژاد[۲]*، محمدامین حجازی[۳]

۱- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، تبریز، ایران.
۲- دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، دانشیار گروه بیوتکنولوژی، تبریز، ایران.
۳- فوق دکتری، استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور، تبریز، ایران.
* نویسنده مسئول مکاتبات: atarinejad@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۵/۲۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۲/۳)

Archive of SID

چکیده

پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی از میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیر مفید و بیماری‌زا شوند. از میان باکتری‌ها، باکتری‌های اسیدلاکتیک، متداول‌ترین نوع باکتری‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک معرفی شده‌اند. این باکتری‌ها در محصولات لبنی وجود داشته و در طول مراحل تخمیر، اسید لاکتیک تولید می‌کنند. هدف از این تحقیق، جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از فلور موجود در شیر، ماست و دوغ سنتی مناطق کلیبر، هریس و ورزقان می‌باشد. جهت انجام این مطالعه، باکتری‌های لاکتیکی توسط روش‌های متداول کشت و شناسایی بر اساس خواص بیوشیمیایی شناسایی شدند و مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفراوی مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس برای شناسایی دقیق‌تر با جفت آغازگرهای اختصاصی، ژن 16S rRNA باکتری‌ها تکثیر داده شد و بعد از خالص‌سازی محصول PCR، ژن مورد نظر تعیین توالی گردید. در نتیجه این بررسی، ۱۷ سویه لاکتوباسیلوس و ۶ سویه انتروکوکوس از مناطق کلیبر، هریس و ورزقان جدا شده‌اند که می‌توانند کاندید مناسبی برای بررسی‌های بیشتر به عنوان پروبیوتیک باشند.

واژه‌های کلیدی: **انتروکوکسی، باکتری‌های پروبیوتیک، ژن 16S rRNA، لاکتوباسیلی**

www.SID.ir

مقدمه

مفهوم امروزی پروبیوتیک عبارت است از اجرام زنده‌ای که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا شوند (Klaenhammer, 2000). اخیراً آزمون‌های بالینی اثرات مفید باکتری‌های پروبیوتیک از قبیل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تحریک سیستم ایمنی، تعدیل هموستازی ایمنی سیستمیک، خصوصیات ضد توموری و اصلاح عدم تحمل لاکتوز را نشان داده‌اند. همچنین محققان نشان داده‌اند که باکتری‌های پروبیوتیک با تولید باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی، رشد پاتوژن‌ها را مهار می‌کنند (Schrezenmeir and Vrese, 2001). شواهد نشان می‌دهند که میکروارگانیسم‌های معینی به ویژه ارگانیسم‌های تولیدکننده اسید لاکتیک که ساکنان طبیعی مجرای معده‌ای- روده‌ای هستند، به بازسازی تعادل میکرواکولوژیکی روده کمک می‌کنند. بهینه‌سازی میکروبیوتای همزیست با دستگاه گوارشی به وسیله سویه‌های اختصاصی از میکروبیوتای روده سالم، اساس درمان پروبیوتیکی را تشکیل می‌دهد (Saarela *et al*., 2002). از میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم‌ترین گروه شناخته شده‌اند که در این میان دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیر شده محسوب می‌شوند (Klaenhammer, 2000). جنس لاکتوباسیلوس اولین‌بار توسط بیرجینگ Birjing توصیف شده است که شامل ۶۰ گونه و زیرگونه می‌باشد (Ayele *et al*., 2001). لاکتوباسیلوس‌ها به دلیل توانایی‌شان در تخمیر و نیز اهمیت‌شان در سلامتی انسان به عنوان پروبیوتیک‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. آن‌ها ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، پراکسید هیدروژن و نیز باکتریوسین‌ها را در طی تخمیر لاکتیک تولید می‌کنند که اثر حفاظتی آنها در مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (میردامادی و تنگستانی، ۱۳۹۰). انتروکوک‌ها به وسیله تیرسلین Thiercelin توصیف شدند و توزیع وسیع آن‌ها در طبیعت احتمالاً بوسیله ماندگاری و مقاومت به فاکتورهای بازدارنده رشد توضیح داده می‌شوند (Holzapfel *et al*., 2002). تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک‌های صفراوی از جمله خصوصیات اولیه و ضروری است که در این تحقیق برای غربالگری سویه‌های با پتانسیل پروبیوتیکی در نظر گرفته شده است (Durme *et al*., 2001). برای شناسایی دقیق‌تر پروبیوتیک‌ها، علاوه بر شناسایی بیوشیمیایی، استفاده از ژن 16S rRNA و توالی‌یابی در شناسایی مولکولی توسط واکنش PCR انجام شده است (Cakir, 2003). در ایران مطالعاتی در زمینه جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک صورت گرفته است. ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱) از محصولات لبنی سنتی ماست و پنیر موفق به جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس برویس* شدند. تاج‌آبادی و همکاران (۲۰۱۱)، ۴۲ ایزوله لاکتوباسیلوس از محصول سنتی ترخینه و دوغ آن، جداسازی و خواص پروبیوتیکی آن‌ها را بررسی نموده و چهار ایزوله با بالاترین درصد مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا را به دست آوردند (Tajabady *et al*., 2011). بنابراین جداسازی، شناسایی

www.SID.ir

و کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی می‌تواند راهکاری مناسب در جهت ارائه محصولات پروبیوتیک سنتی ایران و سویه‌های پروبیوتیک بومی با خصوصیات عملکردی ویژه باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌های شیر، ماست و دوغ سنتی از شهرستان‌های کلیبر، هریس و ورزقان جمع‌آوری و در فالکون‌های استریل و در مجاورت بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و تا شروع آزمایش در دمای یخچال نگه‌داری شدند.

تهیه تعلیق باکتریایی و کشت اولیه

تهیه تعلیق باکتریایی از نمونه‌های شیر و ماست و دوغ با استفاده از محلول پپتون فیزیولوژیکی استریل (۸/۵ گرم بر لیتر کلرید سدیم و ۱ گرم بر لیتر پپتون باکتریولوژیکی) انجام شد. ابتدا حدود ۱۰ گرم از نمونه‌های ماست با استفاده از یک قاشقک استریل و ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های شیر و دوغ هر کدام به صورت جداگانه به ۱۰۰ میلی‌لیتر PPS (Physiological Peptone Solution) استریل منتقل گردید. پس از یکنواخت نمودن به وسیله تکان دادن به مدت نیم ساعت ۱۰ میلی‌لیتر از تعلیق‌های تهیه شده به صورت جداگانه، به ۲۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS (Man, Rogosa & Sharp) مایع (شرکت سیگما- آلدریچ آمریکا) انتقال یافت تا باکتری‌ها به حداکثر مقدار خود برسند و در شرایط کم هوازی (شرایط اتمسفری با فشار اکسیژن پائین) و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه (شرکت Binder آلمان، مدل B34) گردید. تمامی این مراحل در زیر هود لامینار و شرایط استریل انجام شد (Calicchia *et al.*, 1993).

غربال جمعیت باکتریایی اولیه و انتخاب ایزوله‌های مقاوم به اسید

در این مرحله بعد از کشت ۲۴ ساعته از نمونه‌های شیر و ماست و دوغ در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۱۰ میلی‌لیتر از کشت‌های باکتریایی به بافر PBS (Phosphate Buffered Saline) با pH=۳ تلقیح شدند. سپس به مدت ۲/۵ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند. باکتری‌های زنده مانده (باکتری‌های مقاوم به اسید) در شرایط اسیدی با استفاده از سانتریفیوژ (شرکت Heraeus آلمان، مدل megafuge1.0) ترسیب و به محیط کشت MRS مایع، به منظور غنی‌سازی انتقال یافتند و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با استفاده از سرم فیزیولوژیکی استریل (کلرید سدیم: ۸/۵ گرم بر لیتر) تا ده برابر رقیق شدند و از هر رقت یک میلی‌لیتر و به صورت کشت آمیخته در محیط کشت MRS آگار (شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا) کشت داده شدند. پلیت‌ها در شرایط کم هوازی و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۸-۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. از پلیت‌های دارای پرگنه‌های قابل شمارش، حدود ۱۰ درصد از پرگنه‌ها با مورفولوژی متفاوت جداسازی و روی محیط کشت MRS آگار خالص‌سازی شدند. سپس همه سویه‌ها با استفاده از میکروسکوپ، رنگ‌آمیزی گرم و واکنش کاتالاز بررسی شدند. باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی در محیط کشت MRS مایع با ۲۵٪ گلیسرول استریل و ۲۵٪ شیر پس

Archive of SID

www.SID.ir

چرخ (شرکت Merck آلمان) در دمای ۸۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند (Erkkila *et al.*, 2000).

آزمایش‌های میکروبی

تعیین درصد بقای ایزوله‌ها در شرایط اسیدی معادل با شرایط اسیدی معده

ایزوله‌های جدا شده، در محیط MRS مایع و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. یک میلی‌لیتر از هر کشت باکتریایی در ۹ میلی‌لیتر PBS با pH برابر با ۲/۵ تلقیح شدند و نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردیدند. برای تعیین درصد بقاء، CFU (Colony Forming Unit) در لحظه تلقیح و در انتهای انکوباسیون ۳ ساعته در PBS ، برای هر ایزوله به صورت جداگانه با استفاده از کشت رقت‌های سریالی در محیط آگار MRS تعیین گردید.

تعیین مقاومت ایزوله‌ها به نمک‌های صفراوی

محیط کشت MRS مایع به عنوان کنترل و MRS مایع دارای ۰/۳ درصد املاح صفراوی (شرکت Merck آلمان) به عنوان کشت مورد آزمایش (تیمار) به طور همزمان با یک درصد از کشت باکتریایی فعال ۲۴ ساعته تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷ ساعت انکوبه شدند. منحنی‌های رشد بر اساس جذب نوری برای هر ایزوله رسم و بر اساس اختلاف در جذب‌های نوری متوالی بین کشت‌های کنترل و تیمار به عنوان تأخیر در رشد در نتیجهٔ اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی در نظر گرفته شد (Gilliland *et al.*, 1984).

آزمایشات بیوشیمیایی

شناسایی مورفولوژیکی ایزوله‌ها با استفاده از تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس و رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۶/۵ و ۴ درصد حجمی- وزنی کلرید سدیم در محیط کشت MRS مایع) انجام شد (Wood and Holzapfel, 1995; Garrity *et al.*, 2004).

تعیین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها

الگوهای تخمیر کربوهیدرات‌ها (شرکت Merck آلمان)، (شامل آرابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکارز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز، ملوزیتوز)، برای همه ایزوله‌ها در محیط کشت MRS مایع دارای معرف فنل قرمز به میزان ۰/۵ گرم بر لیتر تعیین گردید. محیط کشت پایه برای انجام واکنش از اجزای اصلی و با حذف گلوگز و عصارهٔ گوشت و با افزودن فنل قرمز تهیه گردید. همهٔ قندها به صورت محلول استوک ۵٪ تهیه و بوسیلهٔ یک فیلتر غشایی ۰/۲ میکرومتر استریل گردید. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول قندهای استریل به ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت پایه افزوده شد. نمونه‌های جدا شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و به مدت ۲۴ ساعت در محیط مایع MRS کشت داده شدند و ۵۰ میکرولیتر از کشت فعال به محیط دارای قندهای اختصاصی تلقیح و به منظور مشاهدهٔ واکنش‌های تأخیری به مدت ۵ الی ۷ روز در دمای ایزولاسیون (۳۷ درجه سلسیوس) انکوبه گردیدند. در پایان مدت انکوباسیون، نتایج بر اساس تغییر رنگ معرف فنل از قرمز به زرد ارزیابی گردید (Harrigan and Mc Cance, 1976).

آزمایشات مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد. ترکیبات لیز بافر (شرکت Merck آلمان) شامل تریس ۱ مولار با pH= ۷/۵، کلرید سدیم ۵ مولار،

www.SID.ir
Archive of SID

EDTA ۰/۵ مولار و SDS ۲ درصد و آب مقطر می‌باشد. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۰/۸ درصد در الکتروفورز به کار گرفته شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر قطعه ژن 16S rRNA (16S ribosomal RNA)

پرایمرهای اختصاصی (شرکت سیناژن) برای تکثیر قطعه 16S rRNA برای ایزوله‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از نرم‌افزار Oligo5 و با کمک توالی‌های 16S rRNA موجود در سایت بانک ژنی NCBI (National Center for Biotechnology Information) طراحی گردید و واکنش PCR با پرایمرهای LF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و LR(5'AAGGTTACCTCACCGACTTC3') اختصاصی ایزوله‌های لاکتوباسیلوس انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمر در ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش PCR (Polymerase Chain Reactoin) با Master mix (۱۲/۵ µl) (شرکت سیناژن)، پرایمر رفت و برگشت هر کدام (۰/۴ µM) و DNA (۵۰ ng/µl) و رساندن حجم نهایی واکنش با آب مقطر استریل به حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

تفکیک قطعات تکثیر یافته

برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. بدین ترتیب که نمونه‌های تکثیر یافته به نسبت ۶ به ۱ با بافر بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. پس از اتمام الکتروفورز (شرکت VWR Scientific، مدل VWR105) به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰، ژل مورد نظر توسط اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و با استفاده از نور UV مشاهده و عکس‌برداری (شرکت Biometra آلمان، مدل BioDocAnalyze) انجام گرفت.

خالص‌سازی محصول PCR

با توجه به دستورالعمل کیت خالص‌سازی (شرکت سیگما- آلدریچ آمریکا) از ژل آگارز، محصول PCR تخلیص گردید.

ارسال جهت توالی‌یابی

محصول خالص‌سازی شده PCR، در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر به همراه دو پرایمر رفت و برگشت (با غلظت‌های ۵۰ پیکومول بر میکرولیتر) در حجم‌های ۵۰ میکرولیتر، برای توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

نرم‌افزارآماری و بیوانفورماتیکی

نتایج بدست آمده با استفاده ازنرم‌افزار آماری SPSS 13 برای لاکتوباسیلوس‌ها و انتروکوکوس ها مورد تجزیه قرار گرفته و گروه‌بندی گردید. هم ردیف کردن مربوط به توالی‌یابی ژن 16S rRNA ایزوله‌ها با استفاده از برنامه بیوانفورماتیکی BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در NCBI صورت گرفت.

یافته‌ها

از ۴ محصول شیر و ماست و دوغ مناطق کلیبر، ورزقان و هریس، در کل ۲۳ ایزوله باکتری با پتانسیل پروبیوتیک جداسازی گردید که شامل ۱۷ ایزوله لاکتوباسیلوس و ۶ ایزوله انتروکوکوس می‌باشد. تفکیک

Archive of SID
www.SID.ir

ایزوله‌هـا و نامگـذاری آن‌هـا در جـدول ۱ آورده شـده است.

جدول ۱- ایزوله‌های جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی

ایزوله‌های انتروکوکوس	ایزوله‌های لاکتوباسیلوس	نمونه لبنی
–	LA1, LA2, LA3, LA4, LA5, LA6, LA7	شیر کلیبر
EB1, EB2, EB3	LB1, LB2, LB3, LB4	ماست کلیبر
ED1, ED2, ED3	LD1, LD2, LD3	ماست ورزقان
–	LC1, LC2, LC3	دوغ هریس
۶	۱۷	کل نمونه‌ها

*E نشان دهنده ایزوله‌های انتروکوکوس و L نشان دهنده ایزوله‌های لاکتوباسیلوس می‌باشد.

تعیین تحمل به اسیدیته برای تمام ۲۳ ایزوله، در بافر PBS با pH برابر با ۲/۵ به طول سه ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انجام شد که نتایج در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲- تعیین درصد بقای ایزوله‌ها در pH=۲/۵ به مدت ۳ ساعت

کمتراز ۱۰٪	بین ۶۰٪ و ۱۰٪	بین ۸۰٪ و ۶۰٪	بیشتراز ۸۰٪	درصد بقاء محصولات
–	LA7, LA5	LA1, LA2, LA3, LA4	LA6	شیر گاو کلیبر
–	LB1, EB1, EB2, EB3	LB2, LB3	LB4	ماست گاو کلیبر
ED2	LD3	LD1, LD2, ED1, ED3	–	ماست ورزقان
–	–	LC2, LC3	LC1	دوغ هریس

بر اساس درصد بقاء، ایزوله‌ها بـه ۴ گـروه حسـاس، مقاومت متوسط، مقاومت خوب و مقاومت بسیار خوب تقسیم شدند. بر اساس این نتایج، ایزولـه ED2 کمتـرین مقاومت و ۴ ایزوله باسیلی شـکل و ۳ ایزولـه کوکسـی شکل مقاومت متوسط و ۱۰ ایزولـه باسـیلی شـکل و ۲ ایزوله کوکسی شکل مقاومت خوب و ایزوله‌های LA6، LB4 و LC1 مقاومت بسیار خوبی را دارا بودند.

بر اساس اختلاف در مـدت زمـان مـورد نیـاز بـرای اینکه میـزان جـذب نـوری بـین محـیط کشـت شـاهد (MRS) و محـیط کشـت تیمـار (MRS+ bill) بـه ۰/۳ واحد برسد، تحمـل بـه نمـک‌هـای صـفراوی محاسـبه گردید. ایجاد تأخیر در رشـد ایزولـه‌هـا بـا نمـک‌هـای صفراوی، در نتایج بر اساس پیشنهاد ارائه شـده توسـط چاتیو و همکاران (۱۹۹۴)، که چهار گروه متمـایز را بـر

www.SID.ir

اساس تأخیر رشد ایجاد شده به وسیله‌ی نمک‌های صفراوی تشخیص داده بودند (Chateau *et al*., 1994)، تحلیل گردیدند:

۱- ایزوله‌های مقاوم (دارای تأخیر رشدی مساوی یا کمتر از ۱۵ دقیقه)

۲- ایزوله‌هایی با تحمل بالا (تأخیر رشدی بین ۱۵ و ۴۵ دقیقه)

۳- ایزوله‌هایی با تحمل ضعیف (دارای تأخیر رشدی بین ۴۰ و ۶۰ دقیقه)

۴- ایزوله‌های حساس (تأخیر رشدی بیشتر از ۶۰ دقیقه)

۲۳ ایزوله منتخب، بر اساس تأخیر رشد گروه‌بندی شدند که نتایج در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- تعیین مقاومت به نمک‌های صفراوی

تأخیر رشد برحسب دقیقه	d≤15	15≤d≤40	40≤d≤60	d≥60
ایزوله‌ها	مقاوم	تحمل بالا	ضعیف	حساس
LA3, LB4, LB1	+			
LA1, LA2, LA4, LA6, LB2, LB3, EB2, EB3, LD1, LD3 LC3, LC1		+		
LA5, EB1, LD2, ED1, ED3, ED2, LC2,			+	
LA7				+

* علامت + نشان‌دهنده اعضای گروه است.

*A (شیر گاو کلیبر)، B (ماست گاو کلیبر)، C (دوغ هریس)، D (ماست ورزقان)

بعد از انتخاب باکتری‌های مقاوم به اسید و تعیین میزان تحمل آن‌ها به شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی، شناسایی مقدماتی آن‌ها با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. با توجه به مشخصات فنوتیپی، بیوشیمیایی و الگوی تخمیر قندی ایزوله‌های لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس (جدول۴) و رسم دندروگرام مربوطه، لاکتوباسیلوس‌ها با ضریب تشابه ۱۴ درصد در پنج گروه و انتروکوکوس‌ها با ضریب تشابه ۱۵ درصد در سه گروه، قرار گرفتند. شکل ۱ دندروگرام حاصل را برای ایزوله‌های لاکتوباسیلوس و شکل ۲ دندروگرام ایزوله‌های انتروکوکوس را بر اساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی نشان می‌دهد.

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۴- مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سویه‌های لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس استاندارد و سویه‌های جدا شده با پتانسیل پروبیوتیکی

سویه ها	گرم	کاتالاز	رشد در ۱۰°C	رشد در ۱۵°C	رشد در ۴۵°C	رشد در نمک ۴٪	رشد در نمک ۶/۵٪	آرابینوز	اینوزیتول	ترهالوز	رافینوز	رامنوز	ریبوز	زایلوز	ساکارز	سلوبیوز	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکز	لاکتوز	مانوز	مانیتول	ملوبیوز	ملوزیتوز
لاکتوباسیلوس پروبیس	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لاکتوباسیلوس دایورجنس	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
لاکتوباسیلوس فرمنتوم	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
لاکتوباسیلوس کوربفیرسوس	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
لاکتوباسیلوس واسینوستر کوس	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
انتروکوکوس دورانس	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
انتروکوکوس مونداتی	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
LA1	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
LA2	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
LA3	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
LA4	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
LA5	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-

Archive of SID

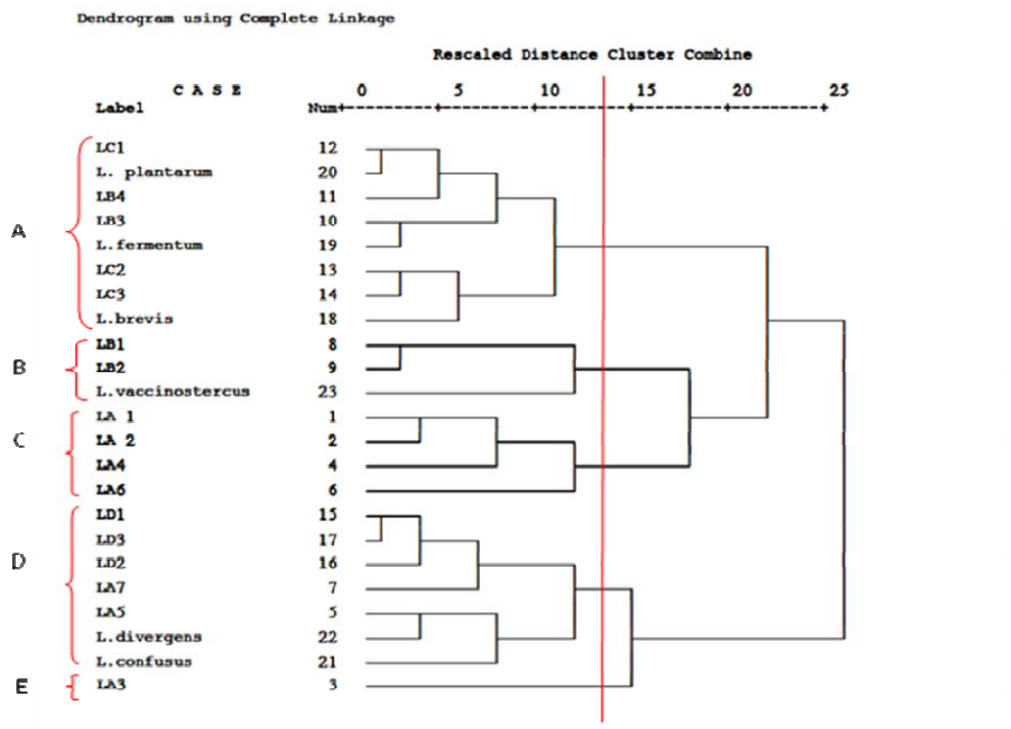
www.SID.ir

ادامه جدول ۴

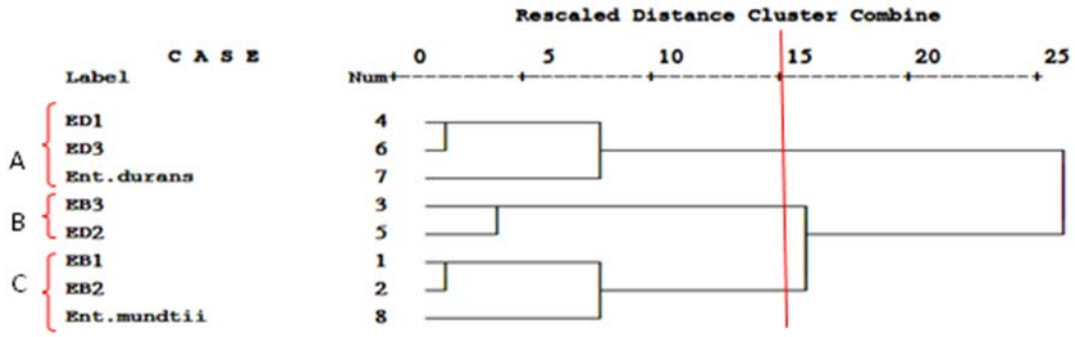
سویه ها	گرم	کاتالاز	رشد در $10^{\circ}C$	رشد در $15^{\circ}C$	رشد در $45^{\circ}C$	رشد در نمک ۴٪	رشد در نمک ۶/۵٪	آرابینوز	اینوزیتول	ترهالوز	رافینوز	رامنوز	ریبوز	زایلوز	ساکارز	سلوبیوز	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکز	لاکتوز	مانوز	مانیتول	ملوبیوز	ملوزیتوز
LA6	+	−	−	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	−
LA7	+	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−
LB1	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	−	−	+
LB2	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	−	−	−
LB3	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	−	−	−
LB4	+	−	−	+	−	+	−	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
LC1	+	−	−	+	−	+	−	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LC2	+	−	−	+	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	+	−
LC3	+	−	−	+	−	+	−	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+
LD1	+	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−
LD2	+	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−
LD3	+	−	−	+	−	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−
EB1	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
EB2	+	−	+	+	−	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
EB3	+	−	+	+	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	+
ED1	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−
ED2	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−
ED3	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−	−	−

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- دندروگرام مربوط به ایزوله‌های لاکتوباسیلوس



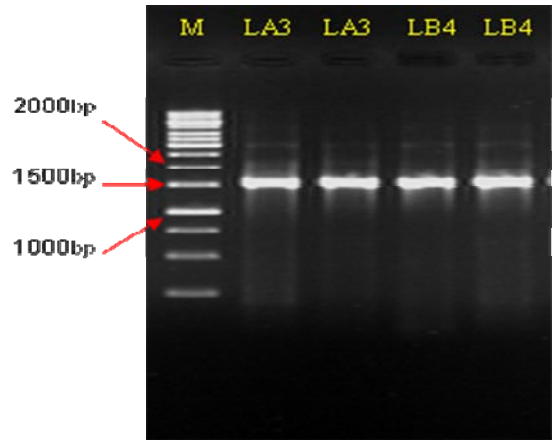
شکل۲- دندروگرام مربوط به ایزوله‌های انتروکوکوس

با رسم دندروگرام، ایزوله‌های لاکتوباسیلوس با ضریب تشابه ۱۴ درصد به پنج گروه A, B, C, D و E تقسیم‌بندی شدند. گروه A الگوی رشدی و الگوی تخمیر کربوهیدراتی نزدیکی با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیاوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس برویس* نشان دادند. LC1 مشابه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و ایزوله LB3 الگوی کاملاً مشابه با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* را نشان دادند. در این گروه دو ایزوله LC2 و LC3 شبیه هم و با ضریب تشابه ۷ درصد از *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شدند. در گروه B دو ایزوله LB1 و LB2 الگوی

www.SID.ir

نزدیکی با *لاکتوباسیلوس واسینوستارکوس* نشان دادند. چهار ایزوله در گروه C قرار گرفتند. گروه D شامل پنج ایزوله می‌باشد که الگوی تخمیر قندی تقریبا مشابهی با دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس دایورجنس* و *لاکتوباسیلوس کونفیوسوس* نشان دادند. ایزوله LA3 به تنهایی در گروه E قرار گرفت و جهت شناسایی دقیق‌تر به توالی‌یابی ارسال گردید. با رسم دندروگرام سویه‌های انتروکوکوس با ضریب تشابه ۱۵ درصد به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. الگوی قندی ایزوله‌های ED1 و ED3 در گروه A مشابه انتروکوکوس دورانس بود. در گروه B دو ایزوله ED2 و EB3 مشابه هم و مربوط به یک سویه می‌باشند و ایزوله‌های EB1 و EB2 با ضریب تشابه ۸ درصد از *انتروکوکوس موندتی* جدا شدند.

در روش‌های شناسایی مولکولی و انجام PCR برای ایزوله‌های جدا شده، نتایج حاصل، نواربندی تکثیر یافته را در ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید در دو تکرار نشان می‌دهد که در شکل ۳ آورده شده است.



شکل۳- الکتروفورز محصولات تکثیری توالی‌های ژن 16S rRNA برای ایزوله‌های جدا شده لاکتوباسیلوس

با توجه به این‌که ایزوله‌های جداسازی شده از محصولات لبنی بومی می‌باشند و گونه و زیرگونه آن‌ها به طور دقیق مشخص نبود، ابتدا به تشخیص جنس باکتری اقدام گردید. به این ترتیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با اطمینان بیشتر ایزوله‌ها مورد تأیید قرار گرفتند که جهت تشخیص، دو ایزوله LA3 و LB4 از لاکتوباسیلوس‌ها برای توالی‌یابی ارسال گردید. مقایسات نشان می‌دهد که نتایج توالی‌یابی برای ایزوله LA3 حاکی از تشابه ۱۰۰ درصد ۱۴۶۰ نوکلئوتید با توالی 16S rRNA ثبت شده در بانک اطلاعاتی برای *لاکتوباسیلوس کازئی* زیرگونه ۰۶۰ بود. بلاست توالی 16S rRNA ایزوله LB4 با توالی موجود در بانک اطلاعاتی نشان داد که این سویه متعلق به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه KSBT 56 با تشابه ۹۹ درصد می‌باشد که توالی ژن 16S rRNA مربوط به این دو ایزوله در بانک ژنی NCBI در حال ثبت هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

محصولات لبنی سنتی آذربایجان، منابع با ارزشی جهت جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک هستند. افزودن این نوع باکتری‌ها به عنوان استارتر به پنیر و ماست‌های صنعتی این امکان را فراهم می‌کند که محصولات لبنی با ویژگی‌های مطلوبی به بازار عرضه شود. در ضمن مصرف کنندگان نیز این اجازه را می‌یابند که راه جدیدی برای بهره‌مندی از سلامتی بیابند. زیرا مصرف این باکتری‌ها می‌تواند سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی را تقویت کند (Prasad *et al.*, 1998). همچنین در بازار جهانی، پروبیوتیک‌های مورد استفاده در صنایع غذایی مانند ماست‌های پروبیوتیک، افزودنی‌های غذایی و فرمولاسیون‌های دارویی از ارزش بسیار بالایی برخوردار هستند (Acharya and Shah, 2002).

Archive of SID
www.SID.ir

از شاخص‌های باکتری‌های پروبیوتیک، تحمل شرایط اسیدی و مقاومت به املاح صفراوی است که با تعیین این ویژگی‌ها می‌توان اختلاف ایجاد شده در بین سویه‌های پروبیوتیک را بررسی کرد (Durme *et al.*, 2001). در این پژوهش با استفاده از روش جداسازی ذکر شده ۲۳ ایزوله مقاوم به اسید از محصولات لبنی سنتی شیر و ماست و دوغ مناطق کلیبر، هریس و ورزقان جمع‌آوری شده است. با توجه به این‌که تحمل محیط اسیدی معده، تنها یکی از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد و در صورت نداشتن تحمل بالا به شرایط اسیدی و داشتن سایر خصوصیات پروبیوتیکی مثل مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی، توانایی کلونیزاسیون به سلول‌های اپیتلیال روده‌ای و سایر خصوصیات بیولوژیکی مفید، می‌توان میکروارگانیسم‌های مورد نظر را با استفاده از میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم یا از طریق افزایش دوز مصرفی به دستگاه گوارشی رساند. تحقیقات نشان داده است که میکروکپسولاسیون با آلژینات سدیم به طور مؤثر میکروارگانیسم را از تیمار اسیدی و دمایی در موقع انتقال به روده، بدون تأثیر منفی بر روی عملکرد پروبیوتیکی، حفاظت می‌کند (Kim *et al.*, 2006). در دستگاه گوارشی انسان میانگین غلظت نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد وزنی/ حجمی است و برای انتخاب ایزوله‌های مقاوم به صفرا، بحرانی تلقی می‌شود. در مطالعه‌ای که توسط چاتیو انجام شد، تأثیر نمک‌های صفراوی بر روی ۳۸ ایزوله لاکتوباسیلوس مورد آزمایش قرار گرفت. نیمی از ایزوله‌های مورد آزمایش به آرامی تحت تأثیر املاح صفراوی ۰/۳ درصد قرار گرفتند و تأخیر رشد زیر یک ساعت را تا رسیدن به جذب نوری ۰/۳ در طول موج ۶۰۰ نانومتر در محیط کشت MRS مایع در مقایسه با کشت کنترل بدون نمک‌های صفراوی نشان دادند (Chateau *et al.*, 1994). غلظت ۰/۳ درصدی از املاح صفراوی نیز در این مطالعه برای ارزیابی قابلیت رشد ۲۳ ایزوله انتخاب گردید که ایزوله‌ها با سطوح مختلفی از مقاومت قادر به رشد در این محیط کشت بودند. یافته‌های ما در این آزمایش با یافته‌های موجود در مطالعات قبلی مطابقت داشت. در مورد همه سویه‌های آزمایش شده تأخیر در رشد سویه‌های تیمار داده شده با املاح صفراوی نسبت به کشت کنترل مشهود بود. همچنین نوسان در میزان مقاومت در بین گونه‌های مختلف مشاهده شد. در بررسی تنوع موجود در دندروگرام مربوط به ایزوله‌های لاکتوباسیلی پنج گروه‌بندی به دست آمد که بیشترین تنوع مربوط به گروه A می‌باشد که به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس برویس* تشخیص داده شدند. به دلیل تنوع بیشتر در این گروه ایزوله LB4 جهت انجام شناسایی مولکولی انتخاب شد. همچنین ایزوله LA3 با اختلاف تنوع بیشتری به طور جداگانه در گروه E قرار گرفت و برای شناسایی مورد آزمایش مولکولی جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی قرار گرفت. در دندروگرم مربوط به تست‌های بیوشیمیایی ایزوله های انتروکوکسی نیز سه گروه‌بندی حاصل شد. گروه A الگوی نزدیکی با *انتروکوکوس دورانس* نشان دادند. گروه C نیز خصوصیات مشابه با *انتروکوکوس موندتی* را نشان داد و ایزوله‌های گروه B با ضریب تشابه ۱۷ درصد از گروه C جدا شدند.

www.SID.ir

شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر براساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبسترهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی عدم تکرارپذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز می‌باشد. زیرا علاوه بر متفاوت بودن شرایط کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد (Ayele *et al*. 2001). بنابراین شناسایی دقیق‌تر توسط روش‌های مولکولی انجام گرفته است که قدرتمندترین و صحیح‌ترین روش، تفریق سویه‌ها است (Coeuret *et al*., 2003). تحقیقات متعددی جهت شناسایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA صورت گرفته است. در مطالعه‌ای بر روی محصولات لبنی کلومبیا، ۱۷ ایزوله جداسازی شد و شناسایی براساس تست‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن 16S rRNA انجام گردید و نشان داده شد که فراوان‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک شناسایی شده *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* بودند (Perea *et al*., 2007).

در این تحقیق با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA، ایزوله LA3 جدا شده از شیر سنتی شهرستان کلیبر به عنوان *لاکتوباسیلوس کازئی* ۰۶۰ و ایزوله LB4 جدا شده از ماست سنتی شهرستان ورزقان به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* KSBT 56 شناسایی شدند که با نتایج به دست آمده از تست‌های بیوشیمیایی کاملاً مطابقت داشتند. گونه‌های جنس لاکتوباسیلوس میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک مطرح شده در دنیا هستند که به عنوان استارتر در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cakir, 2003; Aquilanti *et al*., 2007).

نائول و همکاران (۲۰۱۱) از محصول لبنی سنتی موراکان، ۱۸ ایزوله مربوط به سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* شناسایی کردند که همگی مقاوم به اسید معده و نمک‌های صفراوی بوده و فعالیت آنتاگونیستی قوی نسبت به باکتری‌های بیماری‌زا نشان دادند.

Dorrit و همکاران (۲۰۱۳) از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* IMDO 788 به عنوان کشت استارتر در محصولات تخمیری سبزیجات استفاده کردند و نشان دادند که این سویه باعث تسریع فرایند تخمیر و افزایش غلظت و کیفیت محصولات نهایی شده و برای اجتناب از رشد مخمر ضروری می‌باشد.

با توجه به‌اینکه سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* شناسایی شده در این پژوهش دارای خواص پروبیوتیکی از جمله مقاومت به شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی می‌باشند، می‌توانند به عنوان کاندید پروبیوتیک معرفی گردند تا بقیه تست‌های ایمنی را گذرانده و در صورت تأیید به عنوان استارتر در محصولات لبنی صنعتی مورد استفاده قرار گیرند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و نیز ریاست محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمالغرب و غرب کشور بخاطر در اختیار قراردادن امکانات پژوهشی این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

- میردامادی، سعید و تنگستانی، مهرنوش (۱۳۹۰). شناسایی، جداسازی، تخلیص و بررسی طیف اثر باکتریوسین‌های چند سویه لاکتوباسیلوس بومی جدا شده از محصولات لبنی ایران. مجله بهداشت مواد غذایی. جلد یک، شماره ۳، صفحات: ۵۵ – ۶۹.

- Acharya, M.R. and Shah, R.K. (2002). Selection of human isolates of bifidobacteria for their use as probiotics. Biochern Biotechnology, 102-103: 81-98.
- Aquilanti, L., Silvestri, G., Zannini, E., Osimani, A., Santarelli, S. and Clementi, F. (2007). Phenotyoic, genotypic and technological characterization of predominant lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. Journal of Applied Microbiology, 103(4): 948- 960.
- Ayele, N., Siv, A. and Goran, M. (2001). Randomaly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of *Lactobacillus* species. Antonie van Leeuwenhoek, 79: 1-6.
- Çakır, I. (2003). Determination of some probiotic properties on *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. Ankara University Thesis of Ph.D.
- Calicchia, M.L., Wang, C.I.E., Nomura, T., Yotsuzuka, F. and Ostato, D.W. (1993). Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and streptomycin resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product. Journal of Food Protection, 56: 954-957.
- Chateau, N., Deschamps, A.M. and Hadj Sassi, A. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology, 18: 42- 48.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M. and Vernoux, J.P. (2003). Isolation, characterization and identification of *Lactobacilli* fcusng mainly on cheeses and other dairy products. Journal of Food Protection, 83: 269.
- Dorrit, W., Silvia, G.T., Medana, Z. and Luc De, V. (2013). Applicability of *Lactobacillus plantarum* IMDO 788 as a starter culture to control vegetable fermentations. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93 (13): 3352- 3361.
- Durme, C., Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D. and Hallorari, S. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *In vivo* findings. Clinical Nutrition, 73(2): 386- 392.
- Ebrahimi, T.M., Ouwehand, A.C., Hejazi, M.A. and Jafari, P. (2011). Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. African Journal Microbiology, 5(1): 20-27.
- Erkkila, S. and Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science, 55: 297-300.
- Garrity, G., Boone M., David, R. and Richard, W. (2004). Bergy's manual of systemstic bacteriology. 4th Edition, Springer pub. Mishigan.
- Gilliland, S.E., Staley, T.E. and Bush, L.J. (1984). Importance of the bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. Journal Dairy Science, 67: 3045- 3051.
- Harrigan, W.F. and Mc Cance, M.E. (1976). Biochemical test for bacteria laboratory method in food and dairy microbiology. Academic Press. London, pp. 25- 29.
- Holzapfel, W.H., Guigas, C. and Franz, C. (2002). General overview of the *Enterococci*. International Symposium on *Enterococci* in Foods, 67: 30- 31.
- Kim, S., Yong Cho, S., Song, O., Shin, I.S., Su Cha, D. and Park, H. (2006). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. Food Science and Technology, 41(3): 493- 500.
- Klaenhammer, T.R. (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. Journal of Nutrition, 130: 415- 416.

Archive of SID

www.SID.ir

- Naoual, J., Abdelaziz, B. and Mohammed, B. (2011). Probiotic potential of *lactobacillus* strains isolated from known popular traditional Moroccan dairy products. British Microbiology Research Journal, 1(4): 79- 94.
- Tajabady, E.M., Ouwehand, A.C., Jafari, P., Bahrami, H. and Heidary Nasrabadi, M. (2011). Evaluation probiotic effects of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh. International Scientific Conference on Probiotic and prebiotic, Slovakia, June 14-16.
- Perea Velez, M., Hermans, K., Verhoeven, T.L., Lebeer, S.E., Vanderleyden, J. and Keersmaecker, S.C. (2007). Identification and characterization of starter lactic acid bacteria and probiotics from columbian dairy products. Journal of Applied Microbiology, 103(3): 666- 674.
- Prasad, J., Gill, H., Smart, J. and Gopal, P.K. (1998). Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotic. International Dairy Journal, 8: 993-1002.
- Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Sandholm, T. (2002). Gut bacteria and health foods- the european perspective. International Food Microbiology, 78: 99- 117.
- Schrezenmeir, J. and Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. American Journal of Clinical Nutrition, 73: 361- 364.
- Wood, B.J.B. and Hozapfel, W.H. (1995). The general of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional, Glasgow.

Archive of SID

www.SID.ir