Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 4، زمستان 1395، صفحات 98-89

توانایی پروبیوتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران

محمود توکلی[1]، زهره حمیدی اصفهانی[2]، محمد امین حجازی[3]، محمد حسین عزیزی[4]، سلیمان عباسی[4]

1- دانشجو دکترای تخصصی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- نویسنده مسئول : دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، پست الکترونیکی: hamidy_z@modares.ac.ir

3- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمالغرب و غرب کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، تبریز، ایران

4- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 94/8/16 تاریخ پذیرش: 94/12/20

چکیده

سابقه و هدف: در ایران فراورده‌های شیری محلی زیادی وجود دارد که حاوی لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشند. این مطالعه با هدف بررسی توانایی پروبیوتیکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* 5 نمونه پنیر جمع‌آوری شده از مناطق روستایی مازندران انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش 300 سویه لاکتوباسیلوس جداسازی گردید و سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی شامل مقاومت به شرایط مشابه دستگاه گوارش، مقاومت به نمک‌های صفراوی، ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و تحمل آنتی‌بیوتیک‌ها مورد آزمون قرار گرفت.

یافته‌ها: توسط آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی 300 سویه لاکتوباسیلوس شناسایی گردید. 19 سویه شرایط اسیدی و نمک صفرای را تحمل نمودند. از بین این 19 سویه ، 8 سویه منتخب *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (4 سویه)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (2 سویه)، *لاکتوباسیلوس پنتسوس* (1 سویه) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (1 سویه) توانایی پروبیوتیک خوبی را نشان دادند. *لاکتوباسیلوس پلانتارم* (MT.ZH293) و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (MT.ZH893 و MT.ZH993) نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاوم بودند. *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*MT.ZH893 به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان داد. 5 سویه MT.ZH193 ، MT.ZH393 ، MT.ZH593 ، MT.ZH893 و MT.ZH993 از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری نمودند.

نتیجه‌گیری: سویه‌های جدا شده از پنیر محلی استان مازندران توانایی پروبیوتیکی خوبی دارند و با انجام آزمون‌های in vitro و *in vivo* بیشتر می‌توان از سویه‌های بومی پروبیوتیک در فرمولاسیون مواد غذایی فراسودمند استفاده کرد.

واژگان کلیدی: ویژگی‌های پروبیوتیکی، میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، مقاومت آنتی‌بیوتیک، مقاومت به شرایط مشابه دستگاه گوارش، پنیر محلی مازندران

• مقدمه

پروبیوتیک‌ها (Probiotics) مکمل‌های غذایی انسان و حیوان هستند که سلامت مصرف کننده را تحت تأثیر قرار می‌دهند. واژه پروبیوتیک گستره وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه باکتری‌ها و همچنین مخمرها را شامل می‌شود. این میکروارگانیسم‌ها قادر هستند تا به دیواره اپیتلیوم روده متصل شده اثرات سلامت بخشی در میزبان ایجاد کنند. اثرات سلامت بخشی پروبیوتیک‌ها با تولید اسیدها و یا باکتریوسین‌ها (Bacteriocins)، رقابت با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و تقویت سیستم ایمنی بدن حاصل می‌شود (1).

جمعیت پروبیوتیک دارای اثرات درمانی و حداقلِ قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها بستگی به سویه مورد استفاده دارد، اما جمعیت 10^{6}-10^{7} پرگنه در گرم محصول مصرف روزانه هر فرد قابل قبول است (2). یکی از مشکلات به کارگیری پروبیوتیک‌ها در فراورده‌های شیری عدم تحمل شرایط اکولوژیک محصول و از بین رفتن آنها در فراورده‌های مذکور است. همچنین ایجاد عطر و طعم نامطلوب توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از مشکلات دیگری است که تولیدکنندگان فراورده‌های شیری با آن مواجه هستند. از این

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

رو جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از فراورده‌های شیری محلی نه تنها منجر به کشف باکتری‌های پروبیوتیک با خصوصیات ویژه می‌شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی برای تولید انبوه فراورده‌های شیری جدید با میکروارگانیسم‌های بومی شود.

فراورده‌های شیری تخمیری منبع مناسبی برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها با توانایی پروبیوتیک می‌باشد (3). انتخاب میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک برای استفاده به عنوان کشت‌های آغازگر در فراورده‌های شیری در دو دسته اصلی با عنوان کاربردهای *in vivo* و *in vitro* قرار می‌گیرند. انواع *in vivo* شامل ایمنی و اثربخشی عملکردی سلول‌های پروبیوتیک در بدن بوده و انواع *in vitro* با خصوصیات تکنولوژیکی پروبیوتیک‌ها در فراورده‌های غذایی مرتبط می‌باشد. جنبه‌های تکنولوژیکی فراورده‌های پروبیوتیک نیز می‌تواند در سه دسته شامل بقاء میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی در فراورده‌های در زمان مصرف، خواص حسی و نیز ویژگی‌های اقتصادی (قیمت نهایی محصول) خلاصه شود. در حقیقت انتخاب بهترین میکروارگانیسم پروبیوتیک بستگی به جنبه‌های مهم مؤثر بر کیفیت و اثربخشی فراورده‌های تخمیری دارد (6-4).

پنیرهای محلی تهیه شده از شیر خام تنوع ژنتیکی بالایی داشته و در مقایسه با سایر فراورده‌های شیری اکوسیستم میکروبی پیچیده ای دارند(7). از سوی دیگر ایران سابقه طولانی در تولید پنیرهای محلی مانند لیقوان دارد. لذا مطالعه تنوع میکروبی به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها در این فراورده‌ها می‌تواند کمک بزرگی به صنعتی شدن انواع پنیرهای محلی و توسعه صنعت پنیرسازی در ایران شود(8).

سویه‌های جدید پروبیوتیک باید نسبت به شرایط سخت دستگاه گوارش انسان که شرایط فیزیولوژی سازگار با توانایی پروبیوتیکی دارند مقاوم باشند (9). لذا در این تحقیق آزمون‌های *in vitro* بر سویه‌های جدا شده از 5 نمونه پنیر محلی مورد ارزیابی قرار گرفت و شناسایی ملکولی سویه‌های برتر انجام شد.

• مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی، معرف‌ها و محیط کشت: گلیکوکولیک اسید (Glycocholic acid: GC)، گلیکو داکسی کولیک اسید (Glicodeoxycholic acid:GDC)، تاروکولیک اسید (Taurocholic acid: TC) و تاروداکسی کولیک اسید (Taurodeoxycholic acid: TDC) از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. پپسین، تریپسین، نمک صفراوی (Oxgall)، اتیدیوم برماید، ژل آگارز و RNase از شرکت سیگما آمریکا خریداری گردید. گلیسرول، نمک طعام، بافر سدیم فسفات، سدیم تیوگلیکولات و هیدروکربن هگزان از شرکت مرک آلمان خریداری شد. آموکسیسیلین، سفتاریکسن، کلرامفنیکل، اریترومایسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، تتراسایکلین و ونکومایسین از موسسه تحقیقات سرم و واکسن رازی تهیه شد. محیط کشت MRS از شرکت مرک آلمان و محیط‌های MHA (Muller Hinton Agar) و BHI agar (Brain Heart Infusion Soft Agar) از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد.

جمع آوری نمونه‌ها: در این تحقیق 5 نمونه پنیر محلی به طور تصادفی از مناطق روستایی استان مازندران شامل بابل (B)، چرات (CH)، آلاشت (A)، شیرگاه (SH) و فیروزکوه (F) جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها تحت شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل گردید و تا شروع زمان آزمایش‌ها در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلوس از پنیر محلی: 30 گرم نمونه در 300 میلی‌لیتر MRS Broth تلقیح گردید و در شرایط بی‌هوازی در دمای 37 °C به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری گردید. در مرحله بعد 25 میلی‌لیتر از مایع به مدت 20 دقیقه و 1000g سانتریفیوژ گردید و توده سلول در 10 میلی‌لیتر محلول فسفات بافر با pH= 2/5 (توسط 5M HCl تنظیم شد) به مدت 2 ساعت در دمای 37 ° C گرمخانه گذاری شد. توده سلولی دو بار توسط محلول رینگر شسته شد و به صورت خطی در محیط MRS agar در دمای 37°C به مدت 48 ساعت به‌صورت بی‌هوازی کشت گردید (10). کلنی‌های کاملاً مجزای میله‌ای، گرم مثبت و کاتالاز منفی از هر پلیت محیط MRS به طور تصادفی انتخاب شده و جهت خالص سازی سه بار مورد کشت مجدد قرار گرفتند. سپس محیط کشت تازه همراه با 15% گلیسرول به سویه‌ها اضافه شده و تا زمان انجام آزمایشات، در دمای 80°C- نگه‌داری شدند.

اندازه‌گیری مقاومت به نمک‌های صفراوی: روش Leite و همکاران (2015) با کمی تغییر برای تعیین توانایی رشد سویه‌های لاکتوباسیلوس در نمک‌های صفراوی شامل GC، GDC، TC و TDC استفاده شد. کلنی‌های منفرد رشد کرده در محیط MRS agar در 5-2 میلی‌لیتر محلول نمک 0/85 % سترون با دانسیته معادل مک فارلند شماره 1 به صورت سوسپانسیون تهیه شد. در مرحله بعد 10 µL از سوسپانسیون تهیه شده در پلیت‌های حاوی نمک‌های صفراوی به صورت نقطه‌ای تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای 37°C تحت شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

بی‌هوازی گرمخانه گذاری شد و رشد کلنی‌ها بعد از 24 تا 48 ساعت ثبت گردید.

مقاومت به نمک صفراوی (oxgall) با کشت سویه‌ها در محیط آگار و مایع بر اساس روش Guo و همکاران (2009) انجام شد. سرعت رشد سویه‌ها در محیط MRS broth با و بدون 0/3 % oxgall اندازه‌گیری شد.

تعیین تحمل به آنتی‌بیوتیک‌ها: تحمل سویه‌های لاکتوباسیلوس به آنتی‌بیوتیک بر اساس روش زیر انجام شد . توسط سوآب سترون (10^7-10^8CFU/ml) سلو ل از هر کدام از سوسپانسیون‌های میکروبی بر روی محیط MHA کشت داده شد. سپس دیسک‌های مختلف آنتی‌بیوتیک بر روی محیط کشت قرار گرفت و به مدت 24 ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری شد. قطر هاله عدم رشد (mm) اندازه‌گیری گردید و نتایج به صورت سویه مقاوم (mm 15≤)، نیمه حساس (mm 20-16) و حساس (mm 21 ≤) گزارش شد (13).

فعالیت ضد میکروبی: روش آگار نقطه بر اساس Ripomonti و همکاران (2011) با کمی اصلاح به منظور تعیین توانایی سویه‌ها برای ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماریزا با منشاء غذایی از قبیل *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica*)، *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*) ، *استافیلوکوکوس ارئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *سودوموناس آیروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa*) ، *انتروکوکوس هیر ا* (*Enetrococcus hirea*) استفاده شد. 2µL از کشت 24 ساعته سویه‌ها به صورت نقطه‌ای در سطح محیط کشت MRS (فاقد سیترات آمونیم و استات سدیم) به صورت بی‌هوازی در دمای 37 °C به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری شد و سپس سلول‌ها توسط کلروفرم به مدت 30 دقیقه غیرفعال شدند. 10mL محیط BHI agar (0/7 %) با 100µL از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا فعال شده مخلوط شده و بر روی سطح محیط MRS agar پخش گردید. محیط‌ها به مدت 24 ساعت در دمای 37°C در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شد. ممانعت و عدم تشکیل هاله واضح یا هاله mm 1> به صورت (±)، هاله 1mm< به صورت (+)، هاله بین 2 و 5 میلی‌متر (++) و عدم تشکیل هاله (–) مشخص گردید.

زنده‌مانی سویه‌ها در شیره مشابه معده و روده: شیره مشابه معده و روده به طور تازه تهیه گردید. برای تهیه شیره معده 3mg/mL پپسین (1:3000) را با بافر فسفات-سیترات 100 میلی مولار با pH برابر 2/5 مخلوط شد. 1 mL از سلول را که دو مرتبه با محلول رینگر سترون شستشو شده بود اضافه گردید. مقاومت سویه‌ها بر اساس شمارش سلولی بعد از 2 ساعت گرمخانه گذاری در دمای°C 37 به دست می‌آید. سپس سلول‌ها جمع‌آوری گردیده و در داخل شیره مشابه روده که با افزودن 1 mg/mL تریپسین به بافر قلیایی 100 میلی مولار pH =8 (Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4) تهیه گردید. نمونه‌ها به مدت 6 ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری گردید و شمارش سلول‌های زنده انجام شد (12).

$$\text{زنده‌مانی (\%)} = \frac{\log N1}{\log N0} \times 100\%$$

N_1: تعداد کل سلول‌های زنده پروبیوتیک بعد از انجام تیمار شرایط دستگاه گوارش

N_0: تعداد کل سلول‌های زنده پروبیوتیک اولیه

شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش مولکولی تعیین ردیف ناحیه 16S rRNA: برای توالی‌یابی و شناسایی دقیق سویه‌ها به روش مولکولی، تکثیر ژن 16S rRNA که بر اساس نواحی محافظت شده‌ی این ژن عمل می‌کند، انجام شد. برای انجام واکنش PCR از پرایمرهای عمومی پرایمر پیش رو: با توالی (5′-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3′) و پرایمر معکوس: با توالی (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′) (Biotez, Berlin, Germany) استفاده شد(15). سیکل حرارتی به صورت زیر برنامه‌ریزی شد: واکنش زنجیرهٔ پلیمرازی با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه، 25 چرخه با مرحله واسرشته سازی در 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای 61 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه، بسط در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و نهایتاً یک چرخه بسط نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه انجام شد.

فراورده‌های واکنش PCR جهت تعیین توالی به صورت خوانش یک طرفه به شرکت Macrogen کره ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این تحقیق از روش آماری multiattribute decision-making برای مشخص کردن سویه‌های برتر استفاده گردید. از نرم‌افزار Excel 2007 برای رسم نمودار استفاده شد.

• یافته‌ها

اندازه‌گیری مقاومت به نمک‌های صفراوی: مقاومت لاکتوباسیوس‌ها نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی (0/3 تا 2 %) مورد آزمون قرار گرفت. جدول 1 زمان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

تأخیر بین 0/11 تا 2/65 را نمایش می‌دهد. سویه B29 با زمان تأخیر 0/11 ساعت کوتاه ترین و سویه F12 با زمان تأخیر 2/65 ساعت طولانی‌ترین زمان تأخیر را نشان داد. بنابراین سویه B29 در محیط کشت MRS+0.3% bile قادر هست مانند محیط کشت MRS رشد نماید و سازگاری بالایی را نشان می‌دهد. با توجه به جدول 1 سویه B29 همچنین نسبت به غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی مقاوم می‌باشد. بر اساس نتایج جدول 1 ، 19 سویه قابلیت رشد در غلظت 0/3 و 0/5%، 6 سویه در غلظت 1 و 3% ، 3 سویه در غلظت 2% نمک صفراوی را دارند. سه سویه SH10، B29 و B17 قابلیت رشد در تمام غلظت‌ها را دارند. سویه SH16 با وجود زمان تأخیر پایین (0/13 ساعت) ولی در غلظت‌های بالا نمک‌های صفراوی قادر به رشد نمی‌باشد.

تعیین تحمل به آنتی‌بیوتیک‌ها: جدول 2 قابلیت تحمل سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار دیسک را نمایش می‌دهد. همان طور که در این جدول مشاهده می‌شود تمام سویه‌ها نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم هستند. تنها سویه F4 نسبت به جنتامایسین نیمه حساس است و بقیه سویه‌ها مقاوم می‌باشند. سویه‌های B22، F12 و H25 نسبت به آموکسی سیلین و سفتاریکسن مقاوم هستند (جدول 2). لذا این سویه‌ها می‌توانند به مصرف بیمارانی که تحت درمان با این دو آنتی‌بیوتیک هستند قرار بگیرد. سویه‌های F12 و H25 به تمام آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این تحقیق مقاوم اند. 12 سویه نسبت به کلرامفنیکل حساس هستند.

جدول1. مقاومت 19 سویه لاکتوباسیلوس به نمک‌های صفراوی جدا شده از پنیر محلی مازندران

سویه	اندازه‌گیری مقاومت به صفرا			
	زمان تأخیر (ساعت)، 0/3 % نمک صفراوی	رشد در پلیت (% نمک صفراوی)*		
		0/3	0/5	1	2
A22	0/72±0/07	+	+	–	–
A21	0/43±0/03	+	+	–	–
A10	1/50±0/08	+	+	–	–
SH17	0/61±0/12	+	+	+	–
SH16	0/13±0/05	+	+	–	–
SH11	0/90±0/04	+	+	+	–
SH18	1/07±0/09	+	+	–	–
SH10	0/50±0/01	+	+	+	+
B22	1/09±0/04	+	+	–	–
B29	0/11±0/02	+	+	+	+
B7	1/15±0/11	+	+	+	–
B25	0/20±0/02	+	+	–	–
B9	1/20±0/12	+	+	–	–
B17	0/38±0/02	+	+	+	+
F4	1/50±0/15	+	+	–	–
F8	2/16±0/26	+	+	–	–
F3	2/35±0/39	+	+	–	–
F12	2/65±0/09	+	+	–	–
H25	0/30±0/08	+	+	–	–

* – = عدم رشد و + = رشد مثبت

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

جدول2. مقاومت 19 سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها* به روش انتشار دیسک

سویه ها	E15	AMX25	Ch30	CRO30	T30	GM10	S10	V30
A22	نیمه حساس	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
A21	مقاوم	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
A10	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
SH17	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
SH16	نیمه حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
SH11	حساس	حساس	حساس	حساس	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
SH18	نیمه حساس	حساس	حساس	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
SH10	مقاوم	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
B22	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
B29	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
B7	نیمه حساس	نیمه حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
B25	مقاوم	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
B9	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم
B17	حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
F4	نیمه حساس	حساس	حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم
F8	مقاوم	نیمه حساس	مقاوم	حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
F3	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
F12	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
H25	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

*آنتی‌بیوتیک‌ها: E15= اریترومایسین (10 µg)، AMX25= آموکسی سیلین (25µg)، Ch30= کلرامفنیکل (30µg)، CRO30= سفتریکسن (30µg)، T30= تتراسایکلین (30µg)، GM10= جنتامایسین (10µg)، S10= استرپتومایسین (10µg)، V30= ونکومایسین (30µg).

فعالیت ضد میکروبی: جدول 3 نشان می‌دهد که تمام سویه‌های لاکتوباسیلوس به جزء B22، B9، F3 و F12 قادرند *سودموناس آئروژینوسا* را مهار نمایند. سویه B22 تنها میکروارگانیسم بیماری‌زا *انترکوکوس هیرا* را کنترل می‌نماید و سویه B17 تنها *سودموناس آئروژینوسا* را مهار می‌کند. سویه B9 بر روی هیچ‌کدام از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا اثری ندارد. SH11، H25، F4، B29، B25، A21 و B7 تمام میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا را مهار نموده‌اند.

زنده‌مانی سویه‌ها در شیره مشابه معده و روده: نمودار 1 مقاومت سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی نسبت به شرایط دستگاه گوارش نمایش می‌دهد. زنده‌مانی سویه‌ها در شرایط دستگاه گوارش بین 68/8 تا 94/9 % متغیر است. بالاترین مقاومت به شرایط دستگاه گوارش مربوط به سویه B22 که از پنیر محلی بابل جداسازی شده بود و کمترین مقاومت را سویه CH25 که از پنیر محلی چرات به دست آمد. سویه‌های جدا شده از پنیر محلی شیرگاه مقاومت بالاتری نسبت به شرایط دستگاه گوارش نشان دادند.

شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از روش مولکولی: با توجه به نتایجی که توسط آزمایش‌های *in vitro* به دست آمد، در مجموع 8 جدایه (F4،B17،B7،SH11،B29،SH10، F3 و SH17) انتخاب و مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر استخراج شد. در مرحله‌ی بعد با کمک پرایمرهای عمومی 27FYM و 1492R تکثیر ژن 16S rRNA انجام گرفت. DNA در همهٔ نمونه‌ها به صورت تک نوار و با اندازهٔ تقریبی 1500 جفت نوکلئوتید مشاهده گردید. مقایسه توالی سویه‌ها با بانک اطلاعات NCBI نشان داد که با تشابه بالای 97% سویه‌های F4، B17، B7 و SH11 متعلق به جنس *پلانتارم* ، سویه‌های *B29* و SH10 جنس *فرمنتوم*، سویه F3 جنس پنتسوس، سویه SH17 جنس *کازئی* می‌باشد. سویه ها بر اساس اسامی محققین (محمود توکلی و زهره حمیدیی) و سال انجام آزمون (1393) به طور قراردادی به صورت زیر نام گذاری شد:

L. plantarum (MT.ZH193, MT.ZH293, MT.ZH393 and MT.ZH593), *L. casei* (MT.ZH493), *L. petntosus* (MT.ZH693), and *L. fermentum* (MT.ZH893 and MT.ZH993)

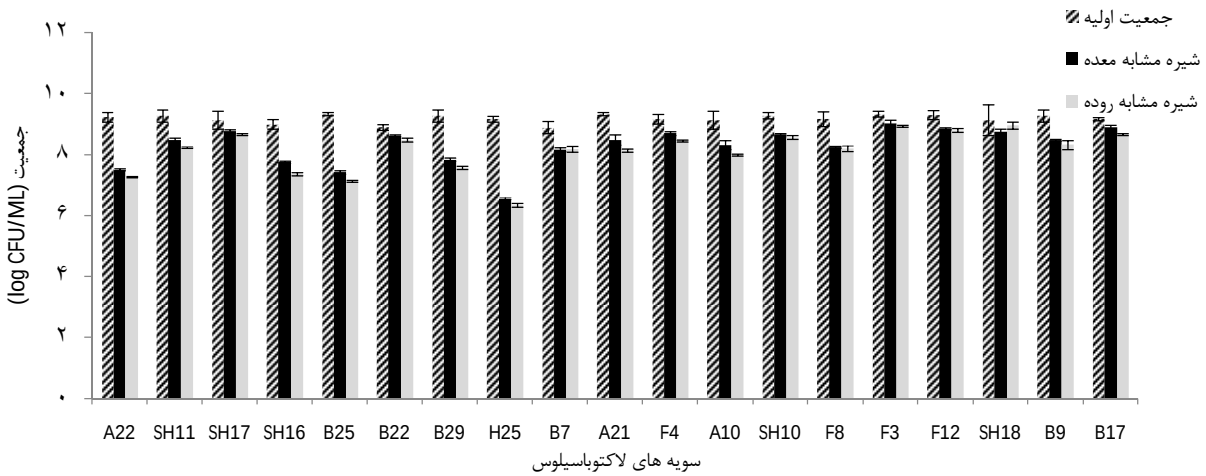
www.SID.ir

Archive of SID

جدول 3. ویژگی‌های ضد میکروبی توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی مازندران

سویه ها	ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا*				
	I	II	III	IV	V
A22	–	–	++	–	++
A21	++	++	++	++	++
A10	+	–	–	++	++
SH17	++	++	–	–	++
SH16	–	++	–	++	++
SH11	++	++	++	++	++
SH18	–	++	++	++	++
SH10	++	–	++	++	++
B22	–	–	++	–	–
B29	++	++	++	++	++
B7	++	++	++	++	++
B25	++	++	++	++	++
B9	–	–	–	–	–
B17	–	–	–	–	++
F4	++	++	++	++	++
F8	++	++	–	++	++
F3	++	++	++	++	–
F12	++	++	–	–	–
H25	++	++	++	++	++

*میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا: I = اشرشیاکلی ، II = سالمونلا انتریکا، III = انترکوکوس هیرا، VI = استافیلوکوکوس ارئوس، V = سودوموناس آیروژینوزا .*فعالیت* : ممانعت و عدم تشکیل هاله واضح یا هاله mm 1> به صورت (±)، هاله mm 1< به صورت (+)، هاله بین 2 و 5 میلی‌متر (++) و عدم تشکیل هاله (–)



نمودار 1. تأثیر شیره مشابه دستگاه گوارش بر روی سویه‌های جدا شده از پنیر محلی مازندران

• بحث

در این تحقیق در ابتدا 300 سویه لاکتوباسیلوس از پنج نمونه پنیر استان مازندران جداسازی گردید. 19 سویه لاکتوباسیلوس توانستند شرایط pH برابر 2/5 به مدت 2 ساعت و نمک صفراوی 0/3 % را تحمل نمایند. آزمون‌های *in vitro* بر روی آنها انجام شد. در آخر به کمک روش آماری multi-attribute decision making 8 سویه برتر انتخاب گردید (16) و شناسایی ملکولی 16s rDNA بر روی آنها صورت پذیرفت.

در جدول 1 مقاومت سویه‌های لاکتوباسیلوس به نمک‌های صفراوی نشان داده شد. نتایج نشان داد که سویه‌های مورد

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

استفاده در این آزمون مقاومت خوبی به نمک‌های صفراوی دارند و لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از پنیرهای محلی قادرند دامنه وسیعی از نمک‌های صفراوی را تحمل نمایند. نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج سایر محققین در این زمینه قابل مقایسه است.

Vizoso-Pinto و همکاران سال (2006) غلظت‌های 0/15 تا 0/5 % و Mathara و همکاران سال (2008) غلظت 0/3% نمک‌های صفراوی را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج مشابهی بر روی مقاومت لاکتوباسیوس‌ها نسبت به نمک‌های صفراوی توسط سایر محققین گزارش شده است (19، 18).

تعیین مقاومت سویه‌ها با توانایی پروبیوتیک نسبت به غلظت‌های بالای نمک‌های صفراوی از لحاظ فن‌آوری و فیزیولوژی حائز اهمیت است چرا که نه تنها یک روش انتخاب ویژگی‌های پروبیوتیکی است بلکه در مورد یک سوش معین منحصربه‌فرد است (18). نمک‌های صفراوی از طریق به هم ریختن ساختمان دیواره سلولی باعث مرگ میکروارگانیسم‌ها می‌گردد بنابراین مقاومت به نمک‌های صفراوی یکی از ضروری‌ترین ویژگی پروبیوتیک‌ها می‌باشد که زنده‌مانی و فعالیت آنها را در روده کوچک حفظ می‌نماید. پروبیوتیک‌ها با تولید آنزیم‌های آبکافت کننده نمک‌های صفراوی اثرات آنها را خنثی کرده و سطح کلسترول سرم خون بیماران کلسترول بالا را پایین می‌آورند (19). بیشتر مطالعات انجام شده روی مقاومت سویه‌های لاکتوباسیلوس در مقابل نمک‌های صفراوی رشد با تأخیر آن‌ها در محیط کشت حاوی نمک‌های صفراوی را نشان می‌دهد که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مشابه بود (19، 18).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که قابلیت تحمل سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از پنیر محلی به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف متفاوت می‌باشد. نتایج نشان داد که تمام سویه‌ها نسبت به استرپتومایسین، ونکومایسین و جنتامایسین (به جزء F4) مقاومند. Zhou و همکاران (2005) مقاومت بالای لاکتوباسیلوس‌ها نسبت به استرپتومایسین را نشان دادند. Kirtzalidou و همکاران (2011) نشان دادند برخی سویه‌های لاکتوباسیلوس از قبیل *L. rhamnosus, L. casei, L. plantarum, L. fermentum, L. brevis* و *L. curvatus* به طور ذاتی نسبت به ونکومایسین مقاوم هستند. مقاومت به ونکومایسین و استرپتومایسین در برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس در کروموزوم بیان می‌شود بنابراین قابل انتقال به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا نمی‌باشد و از لحاظ سلامتی نگرانی وجود ندارد. مقاومت به ونکومایسین توسط سویه‌های لاکتوباسیلوس به حضور دی- آلانین- دی-لاکتات لایه پپتیدوگلیکان به جای دی- آلانین- دی- آلانین متداول می‌باشد. مقاومت سویه‌ها به جنتامایسین که یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزیدی است به دلیل فقدان ناقل الکترونی وابسته به سیتوکروم در لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد (22). همچنین برخی از مطالعات نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از پنیر نسبت به اریترومایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم هستند (24، 23). اساس ژنتیکی و مکانیسم مقاومت لاکتوباسیلوس‌ها به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها هنوز به طور کامل مشخص نیست و تحقیقات در این زمینه ادامه دارد. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در زمان بیماری فلور طبیعی روده دچار تغییر شده و اگر سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک مقاوم باشند فلور طبیعی روده حفظ می‌شود. همچنین در استفاده همزمان آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک مقاومت به آنتی‌بیوتیک خاص زنده‌مانی پروبیوتیک در روده را افزایش می‌دهد. تحمل سویه‌های پنیر محلی مازندران نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش نشان داد که احتمال انتقال ژن مقاومت به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا ناشی از مواد غذایی و یا در داخل روده بسیار کم است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این سویه‌ها ژن مقاومت را حداقل در مورد آنتی‌بیوتیک‌هایی که نسبت به آنها حساس هستند انتقال نمی‌دهند.

جدول 3 نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیلوس تحقیق حاضر قابلیت خوبی در مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا دارد. ویژگی ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها ناشی از ترشح متابولیت‌هایی از قبیل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها می‌باشد (25). Tejero-Sarinena در سال (2012) ویژگی تعدادی سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بر روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا از قبیل *St. aureus, S. typhimurium, E. coli* و *E. faecalis* گزارش نمودند. تحقیقات زیادی نشان می‌دهد مکانیسم‌های وابسته به pH در اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها نقش دارد. دو باکتریوسین نیسین و کارنوسیکلین A به طور تجاری در حال استفاده است (11). مواد ضد میکروبی که توسط پروبیوتیک‌ها به صورت جداگانه و یا ترکیبی تولید می‌شود اثر کشندگی بر روی سایر ریزسازه‌ها دارد. این ترکیبات ضد میکروبی با تأثیر بر روی رقابت منابع انرژی و ترکیبات شیمیایی تکثیر ریزسازه‌های بیماری‌زا را تحت تأثیر قرار می‌دهند. این ترکیبات ضدمیکروبی شامل اسیدهای چرب، اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استوئین و باکتریوسین‌ها است (25، 11).

www.SID.ir

Archive of SID

همان‌طور که در نمودار 1 نشان داده شده است زنده‌مانی سویه‌های لاکتوباسیلوس در شرایط دستگاه گوارش متفاوت می‌باشد. بیش از 2 لیتر شیره معده توسط سلول‌های معده در طی روز ترشح می‌شود. اسید معده تأثیر منفی بر سویه‌های لاکتوباسیلوس ضمن عبور از دستگاه گوارش دارد pH معده بسته به وعده‌های غذایی و زمان هضم غذا که به مدت 3 ساعت طول می‌کشد بین 1/5 تا 4/5 متغیر است. بنابراین هر سویه پروبیوتیک برای زنده مانی طی عبور از دستگاه گوارش باید مقاوم به اسید باشد. در روش متداول برای تعیین زنده‌مانی سویه‌های منتخب آن‌ها را در حضور بافر در معرض محلول با pH پایین در مدت زمان معین قرار می‌دهند و در طی آن تعداد سلول‌های زنده را شمارش می‌نمایند. برکات و همکاران (2011) گزارش دادند مقاومت بالای بعضی باکتری‌ها نسبت به pH پایین می‌تواند به علت تولید ترکیباتی مانند پلی‌ساکاریدها باشد که مانع از اثر اسید بر روی غشای سلولی آن‌ها می‌شود.

Prasad و همکاران (1998) گزارش نمودند تنها تعداد کمی از لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها به طور ذاتی نسبت به شرایط دستگاه گوارش مقاوم هستند. نتایج مشابه ای در رابطه با مقاومت وابسته به سویه نسبت به شرایط دستگاه گوارش در سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از پنیر فیوره ساردو (29)، پنیر بلغاری (30) به دست آمد. مقاومت به شرایط اسیدی بستگی به جنس و سویه دارد و بیفیدوباکترها حساس ترند (31). مقاومت به اسید در میکروارگانیسم‌های لاکتیک اسید با فعالیت آنزیم H^+-ATPase مرتبط است (32). بنابراین تفاوت در مقاومت به شرایط دستگاه گوارش ممکن است به دلیل تفاوت در فعالیت این آنزیم در پروبیوتیک‌ها باشد. به طور کلی استفاده از پروبیوتیک‌ها به همراه غذاهای پرچرب و حاوی پروتئین، میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را در عبور از دستگاه گوارش محافظت می‌کند این تکنیک را می‌توان برای افزایش زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها حین عبور از دستگاه گوارش استفاده کرد. (29).

در این تحقیق آزمون‌های *in vitro* از قبیل مقاومت به نمک‌های صفراوی و شرایط دستگاه گوارش، قابلیت تحمل آنتی‌بیوتیک و فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جدا شده از 5 نمونه پنیر محلی مورد ارزیابی قرار گرفت و شناسایی ملکولی سویه‌های برتر انجام گرفت. نتایج نشان داد که 8 سویه توانایی پروبیوتیکی بالاتری داشتند. البته آزمون‌های *in vivo* و *in vitro* بیشتر از قبیل اثر سویه‌ها بر کلسترول و قند خون موش‌های آزمایشگاهی، چسبیدن به سلول‌های اپیتلیال روده، توانایی تولید باکتریوسین، پر اکسید هیدروژن و آنزیم‌های آبکافت کننده نمک‌های صفراوی برای شناخت سایر ویژگی‌های پروبیوتیک سویه‌های حاضر باید صورت پذیرد تا بتوانیم از این سویه‌ها در تولید فراورده‌های پروبیوتیک سلامت بخش استفاده نماییم.

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

• References

1. Chen, MJ, Chen, KN. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell, USA; 2007. p. 83–107.
2. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Int Dairy J 2003; 13:3–13.
3. Ambadoyiannis G, Hatzikamari M, Litopoulou-Tzanetaki E , Tzanetakis N. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. Food Biotech 2005; 18: 307–325.
4. Østlie MH, Treimo J, Narvhus JA. Effect of temperature on growth and metabolis of probiotic bacteria in milk. Int Dairy J 2005; 15:989–97.
5. Oliveira MN, Sodini I, Remeuf F, Corrieu G. Effect of milk supplementation and culture composition on acidification, textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria. Int Dairy J 2001; 11:935-42.
6. Shah NP. Functional cultures and health benefits. Int Dairy J 2007; 17:1262–77.
7. Pinto VMG, Franz CMAP, Schillinger U, Holzapfel WH. Lactobacillus spp. within vitro probiotic properties from faeces and traditional fermented products. Int. J. Food Microbiol 2006; 109: 205–214.
8. Edalatian, MR, Habibi Najafi M, Mortazavi S, Alegría A, Nassiri, M, Bassami M , Mayo B. Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan & Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. Dairy Sci. Technol 2012; 92(1): 75–90.
9. Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria, a literature survey. Crit Rev Microbiol 2002; 28: 281–370.
10. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Sci 2004;67: 309–317.
11. Leite AMO, Miguel MAL, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VMF, Mayo B, et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. J Dairy Sci 2015; 98: 3622–3632.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

12. Guo Z, Wang J, Yan L, Chen W, Liu XM, Zhang HP. In vitro comparison of probiotic properties of *Lactobacillus casei* Zhang, a potential new probiotic, with selected probiotic strains. LWT 2009; 42:1640–1646.
13. dos Santos KMO, Vieira ADS, Buriti FCA, do Nascimento JCF, de Melo MES, Bruno LM, et al. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Dairy Sci Technol 2015; 95: 209–230.
14. Ripamonti B, Agazzi A, Bersani C, De Dea P, Pecorini C, Pirani S, et al. Screening of species-specific lactic acid bacteria for veal calves multi-strain probiotic adjuncts. Anaerobe 2011; 17: 97–105.
15. Reyes-Escogido L, Balam-Chi M, Rodríguez-Buenfil I, Valdés J, Kameyama L, Martínez-Pérez F. Purification of bacterial genomic DNA in less than 20 min using chelex-100 microwave: examples from strains of lactic acid bacteria isolated from soil samples. Antonie Leeuwenhoek 2010; 98: 465 – 474.
16. Zanakis SH, Solomon A, Wishart N, Dublish S . Multi-attribute decision making: A simulation comparison of selection methods. Euro J Oper Res 1998; 107: 507–529
17. Vizoso-Pinto MG, Franz CMAP, Schillinger U, Holzapfel W. *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. Int J Food Microbiol 2006; 109: 205-214.
18. Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK, Guigas C, Franz C, et al. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. Curr Microbiol 2008; 56: 315–321.
19. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, et al. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. FEMS Microbiol Lett 2005; 244(1): 129–37.
20. Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. J Food Microbiol 2005; 98: 211–217.
21. Kirtzalidou E, Pramateftaki P, Kotsou M, Kyriacou A. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota. Anaerobe 2011; 30:1–4.
22. Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio L, Rúa J, Martínez-Blanco H, Navasa N, García-Armesto MR, et al. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. J Functional Food 2012; 4: 531–541.
23. Comunian R, Daga E, Dupré I, Paba A, Devirgiliis C, Piccioni V, et al. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. Int J Food Microbiol 2010; 138: 151–156.
24. Ammor MS, Flórez AB, Alvarez-Martín P, Margolles A, Mayo B. Analysis of tetracycline resistance tet(W) genes and their flanking sequences in intestinal *Bifidobacterium* species. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 688–693.
25. Oh SJ, Kim MH, Churey JJ, Worobo RW. Purification and characterization of an antilisterial bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. W65. J Microbiol Biotechnol 2003; 13: 680–686.
26. Tejero-Sarinena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. Anaerobe 2012; 18: 530–538.
27. Barakat OS, Ibrahim G, Tawfik N, El-Kholy W, Gad El-Rab A. Identification and probiotic characteristics of Lactobacillus strains isolated from traditional Domiati cheese. Int J Microbiol Res 2011;3: 59–66.
28. Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK. Selection and characterization of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. Int Dairy J 1998; 8: 993–1002.
29. Pisano MB, Casula M, Corda A, Fadda ME, Depilano M, Casentino S. *In vitro* probiotic characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from Fiore Sardo cheese. Ital J Food Sci 2008; 20: 505–516.
30. Georgieva R, Iliev I, Chipeva VA, Dimitonova SP, Samelis J, Danova S. Identification and vitro characterization of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. J Basic Microbiol 2008; 48: 234–244.
31. Sanz, Y. Ecological and functional implications of the acid adaptation ability of Bifidobacterium: a way of selecting improved probiotic strains. Int Dairy J 2007; 17(11):1284–1289.
32. Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. Hþ-ATPase activity in bifidobacterium with special reference to acid tolerance. Int J Food Microbiol 2004; 93(1):109–113.

www.SID.ir

Archive of SID

Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Mazandaran Local Cheese

Tavakoli M[1], Hamidi-Esfahani Z[2], Hejazi MA[3], Azizi MH[4], Abbasi S[4]*

1- PhD student in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*2-*Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: hamidy_z@modares.ac.ir*

3- Associate Prof, Dept. of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology research Institute of Iran, Tabriz, Iran

4- Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received 7 Nov, 2015 **Accepted 20 Mar, 2016**

Background and Objectives: In Iran, there are many traditional dairy products containing Lactobacillus. This study investigates the probiotic potential of Lactobacillus strains obtained from 5 samples of cheese collected from the rural areas of Mazandran Province.

Materials and Methods: Three hundred Lactobacillus strains were isolated and assessed for probiotic potential properties including ability to survive in simulated gastrointestinal condition, tolerance to bile salts, inhibition of pathogenic bacteria, and susceptibility of antibiotic discs.

Results: Totally, 300 strains were identified as Lactobacillus by phenotypical and biochemical testes. Nineteen strains survived in acidic and bile conditions. Among these 19 strains, 8 Lactobacillus strains including L. *plantarum* (4 strains), *L. casei*, *L. petntosus*, and *L. fermentum* (2 strains) showed good probiotic potential. *L. plantarum* (MT.ZH293) and *L. fermentum* (MT.ZH893 and MT.ZH993) were resistant to all the used bile concentrations. *L. fermentum* MT.ZH893 had strong resistance to all the antibiotics tested. Five lactic strains of MT.ZH193, MT.ZH393, MT.ZH593, MT.ZH893 and MT.ZH993 prevented the growth of all foodborne pathogens.

Conclusion: These Lactobacillus strains with probiotic potential may be useful for formulation of functional foods, but further *in vitro* and *in vivo* studies on these strains are still required.

Keywords: Probiotic properties, Pathogenic bacteria l, Antibiotic resistance, Simulated gastrointestinal resistance, Mazandaran local cheese

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 12:10 IRST on Sunday February 19th 2017

www.SID.ir