Food Hygiene, Vol. 11, No. 43, Autumn 2021

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2022.1949266.1340**

Antimicrobial effects of lactic acid bacteria with probiotic ability isolated from traditional yogurts on foodborne pathogenic microorganisms

Sadeghi, M.[1], Tarinejad, A.R.[2], Hejazi, M.A.[3], Nami, Y.[4*]

1. MS. Graduated of Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor of Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
3. Associate Professor of Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran
4. Assistant Professor of Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest & West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran

*Corresponding Author: y.nami@abrii.ac.ir

(Received: 2022/1/7 Accepted: 2022/3/6)

Abstract

The growth of contaminating microorganisms in food products causes serious diseases in humans, and the use of lactic acid bacteria to control these contaminants is a promising and developing method. In this study, lactic acid bacteria were isolated from traditional yogurts and a total of 140 isolates were isolated. The probiotic potential of lactic acid bacteria (resistance to acidic conditions and bile salts, and antibiotic sensitivity) were investigated. The isolates with probiotic potential were used to inhibit food pathogens. The measured halo diameters of the bacterial medium were measured and recorded, and the antimicrobial properties of the strains were compared. ARDRA technique was also used to identify the strains. The results showed that all strains have excellent tolerance to pH 2.5 and bile salt of 0.3% and isolate numbers 12, 100, and 102 are recognized as the most resistant strains against studied food pathogens. Findings from this study showed that yogurt samples are an important source for the production of bacteria with probiotic potential with antimicrobial activity and can be used against food pathogens.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Antimicrobial effects, ARDRA, Lactic acid bacteria

«مقاله پژوهشی»
DOI: 10.30495/JFH.2022.1949266.1340

اثرات ضدمیکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک با توانایی پروبیوتیکی جدا شده از ماست‌های سنتی بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی

مهسا صادقی[۱]، علیرضا تاری‌نژاد[۲]، محمدامین حجازی[۳]، یوسف نامی[٤*]

۱. فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
۳. دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
٤. استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
نویسنده مسئول مکاتبات: y.nami@abrii.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱٤۰۰/۱۰/۱۷ پذیرش نهایی: ۱٤۰۰/۱۲/۱۷)

چکیده

رشد انواع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در محصولات غذایی باعث بیماری‌های جدی در انسان می‌شود و برای کنترل این آلودگی‌ها استفاده از لاکتیک اسید باکتری‌ها روشی امیدوارکننده و درحال‌توسعه است. در این مطالعه، جداسازی لاکتیک اسید باکتری‌ها از ماست‌های سنتی انجام شد که درمجموع ۱٤۰ جدایه جداسازی شدند. توانایی پروبیوتیکی باکتری‌های لاکتیک اسید ازجمله مقاومت به شرایط اسیدی، مقاومت به نمک‌های صفراوی و حساسیت به ده آنتی‌بیوتیک مهم بررسی شد. سپس از باکتری‌های دارای توانایی پروبیوتیکی برای مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی استفاده شد. قطر هاله‌های اندازه‌گیری شده از محیط باکتریایی، اندازه‌گیری و ثبت شد و خواص ضد میکروبی سویه‌ها مقایسه شد. همچنین برای شناسایی سویه‌ها از تکنیک ARDRA استفاده شد. نتایج نشان داد که تمام سویه‌های جداشده تحمل بسیار خوبی در ۲/۵ pH و نمک صفراوی ۰/۳ درصد دارند و جدایه‌های شماره ۱۲، ۱۰۰ و ۱۰۲ به‌عنوان مقاوم‌ترین سویه علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی موردمطالعه شناخته شدند. یافته‌های به‌دست‌آمده از این تحقیق نشان داد که نمونه‌های ماست منبع مهمی برای تولید باکتری‌های دارای توانایی پروبیوتیکی با فعالیت ضد میکروبی هستند و می‌توانند علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی مورداستفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: اثرات ضدمیکروبی، باکتری‌های اسیدلاکتیک، ARDRA

مقدمه

مهار باکتری‌های بیماری‌زا با کمک میکروارگانیسم‌ها روشی نوین و درحال‌توسعه است که در این میان سویه‌های مختلف لاکتیک اسید، باکتری‌های دارای توانایی پروبیوتیکی جداشده از محصولات لبنی نقش اساسی دارند؛ بنابراین شناسایی سویه‌های دارای توانایی پروبیوتیکی که فعالیت ضد میکروبی دارند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. نگرانی مصرف‌کنندگان در مورد کیفیت و ایمنی مواد غذایی باعث پیشرفت و توسعه مطالعات در مورداستفاده از باکتری‌های مفید و متابولیت‌های آن‌ها به‌عنوان ضد میکروب‌های طبیعی برای افزایش ایمنی مواد غذایی شده است (Alizadeh *et al*., 2020). همچنین مطالعات متعدد نشان داده‌اند که باکتری‌های لاکتیک اسید جداشده از فرآورده‌های شیر در شرایط آزمایشگاهی از رشد میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده یا بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند (Ortolani *et al*., 2010). باکتری‌های لاکتیک اسید به‌عنوان مهم‌ترین گروه از بین باکتری‌های پروبیوتیک با تولید مواد ضد میکروبی دارای توانایی غلبه بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی هستند (Shehata *et al*., 2019; Moradi *et al*., 2020). علاوه بر فعالیت ضد میکروبی دیگر اثرات مفید پروبیوتیک‌ها که از طریق مطالعات بالینی تأییدشده‌اند می‌توان به بهبود سیستم ایمنی بدن، فعالیت ضد سرطان، کاهش کلسترول خون و فشار، اصلاح عدم تحمل لاکتوز و پیشگیری از اسهال اشاره کرد. باکتری‌های لاکتیک اسید به دلیل عملکرد زیستی خود می‌توانند خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی را نشان دهند. این اثرات به دلیل تولید ترکیبات و رقابت برای مواد غذایی است. مواد ضد میکروبی تولیدشده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید، اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل، دی‌اکسید کربن و باکتریوسین‌ها هستند. فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک بیشتر به دلیل توانایی تولید اسیدلاکتیک در این میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود که باعث کاهش pH شده و مانع از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای موجود می‌شود (Ramos Pereira *et al*., 2021). لازم به ذکر است که باید ارزیابی ایمنی و مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها قبل از استفاده در تولید مواد غذایی انجام شود (Ouiddir *et al*., 2019). امروزه افزایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، محققین را بر آن داشته تا با روش‌های جدید و به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید، کنترل باکتری‌های بیماری‌زا را میسر سازند. این مطالعه باهدف بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتیک اسید باکتری‌های با توانایی پروبیوتیکی جداشده از ماست‌های سنتی ایران علیه عوامل بیماری‌زای موجود در مواد غذایی صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری

تعداد صد نمونه ماست به‌طور تصادفی از نقاط روستایی و عشایری ۳۱ استان مختلف کشور در فالکون‌های سترون جمع‌آوری و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال و تا شروع آزمایش داخل یخچال نگهداری شدند.

- جداسازی و غنی‌سازی جدایه‌های موردمطالعه

پس از جمع‌آوری نمونه‌ها، برای جداسازی باکتری‌های لاکتیک اسید موجود در نمونه‌های ماست، همگن‌سازی توسط ورتکس انجام شد. سپس از محیط

کشت اختصاصی باکتری‌های لاکتیک اسید MRS (Merck, Germany) برای کشت اولیه نمونه‌ها استفاده شد. برای این منظور محیط MRS broth تهیه شد و سپس یک میلی‌لیتر از هر نمونه داخل 10 MRS Broth ml در فالکون سترون اضافه شد و به مدت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور به‌صورت هوازی گرمخانه گذاری گردید (Aponte *et al.*, 2013). برای خالص‌سازی، هرکدام از نمونه‌های رشد یافته بر روی محیط اختصاصی MRS Agar، کشت خطی ٤ منطقه‌ای توسط لوپ استریل شده با شعله انجام شد. پلیت‌های کشت داده‌شده در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲-٤٨ ساعت داخل انکوباتو قرار داده شد تا کلنی‌ها ظاهر شوند. پس‌ازاین مدت کلنی‌های با شکل مشابه جداسازی شدند. سپس نمونه‌ها در گلیسرول ۳۰ درصد در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Kumar *et al.*, 2012).

- شناسایی اولیه جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی

ابتدا رشد جدایه‌ها در سه دمای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت بدین‌صورت که: یک درصد از تمام نمونه‌های باکتریایی در محیط کشت MRS Broth کشت داده شدند و سپس در سه انکوباتور با دماهای مختلف ۱۰، ۳۷ و ٤٥ درجه سلسیوس به مدت ٢٤ ساعت قرار داده شدند و محیط MRS Broth به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد و رشد آن‌ها در دماهای مختلف با تکنیک رقت‌گیری و شمارش تعداد کلنی‌ها در پلیت بررسی شد. رنگ‌آمیزی از هرکدام از نمونه‌ها انجام شد و نتایج با استفاده از میکروسکوپ نوری Axiostar Plus و با دوربین مدل INFINITYX بررسی شد. همچنین سویه‌های جداسازی شده از ماست‌های سنتی با آب‌اکسیژنه ۳ درصد تلقیح شدند و سویه‌هایی که حباب‌های گاز تولید کردند کاتالاز مثبت و سویه‌هایی که هیچ حبابی تولید نکردند کاتالاز منفی در نظر گرفته شدند (Kermanshahi and Peymanfar, 2012).

- تعیین جدایه‌های مقاوم به شرایط اسیدی

آزمایش تحمل سویه‌ها به بافر فسفات با (pH ۲/٥) مورد ارزیابی وPBS با (pH ۷/٤-۷) به‌عنوان شاهد مورداستفاده قرار گرفت. در این آزمایش برای بررسی مقاومت سویه‌ها به pH ۲/٥، هرکدام از جدایه‌ها بعد از کشت ٢٤ ساعته در MRS مایع در محلول بافر فسفات اسیدی (PBS) با pH ۲/٥ حل شدند. برای این منظور از پلیت‌های الایزای ۹٦ خانه استفاده شد. ظرفیت هرکدام از این چاهک‌ها ۲٥۰ میکرو لیتر است. ابتدا PBS خنثی یک ردیف دور تا دور پلیت‌ها اضافه تا اثر حاشیه‌ای را از بین ببرد. سپس به‌صورت یک‌درمیان در یک ردیف عمودی PBS خنثی با اضافه کردن یک درصد کشت باکتریایی فعال ٤٨ ساعته و در ردیف بعدی PBS با ۲/٥ pH با اضافه کردن یک درصد کشت باکتریایی فعال ٤٨ ساعته، قرار گرفت. سپس به کمک دستگاه الایزا ریدر مقاومت به شرایط اسیدی در صفر، یک، دو و سه ساعت موردبررسی و خوانش قرار گرفت. با روش پیشنهادشده؛ سویه‌ها به ٤ گروه حساس، مقاومت متوسط، مقاومت خوب و مقاومت بسیار خوب تقسیم شدند: گروه ۱ حساس (درصد زنده‌مانی کمتر از ۱۰)، گروه ۲ مقاومت متوسط (درصد زنده‌مانی بین ۱۰ و ٦۰ درصد)، گروه ۳ مقاومت خوب (درصد زنده‌مانی بین ٦۰ تا ۸۰ درصد) و گروه چهار مقاومت بسیار خوب (درصد زنده‌مانی بیشتر از ۸۰ درصد) بودند (Narimani *et al.*, 2015).

- تعیین جدایه‌های مقاوم به نمک صفراوی

برای تعیین جدایه‌های مقاوم به نمک صفراوی، محیط کشتMRS Broth به‌عنوان کنترل و MRS Broth حاوی ۰/۳ درصد صفرا به‌عنوان کشت تیمار مورد آزمایش، به‌طور هم‌زمان با اضافه کردن یک درصد کشت باکتریایی فعال ۲٤ ساعته مطالعه و با استفاده از پلیت‌های الایزا و دستگاه الایزا ریدر همانند اندازه‌گیری مقاومت اسیدی، با بررسی کدورت رشد باکتری در OD_{600} طی صفر، یک، دو، سه و چهار ساعت انجام شد (Kiani *et al*., 2021). سپس درصد زنده‌مانی در۰/۳ درصد نمک صفراوی طی چهار ساعت بدین‌صورت گزارش‌شده است: باکتری‌ها بر اساس مقاومت به نمک صفراوی به چهار گروه، گروه ۱ مقاومت بالا (درصد بقا>٦۰)، گروه۲ مقاوم (٤۰< درصد بقا >٦۰)، گروه ۳ تحمل ضعیف (۱۵> درصد بقا<٤۰)، گروه چهارم حساس به نمک صفراوی (۱۵> درصد بقا) تقسیم شدند (Chateau *et al*., 1994).

- تعیین حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مهم

حساسیت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب) تعیین شد (Canton *et al*., 2009). آنتی‌بیوتیک‌های زیر مورد آزمایش قرار گرفتند: پنی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم)، ونکومایسین (۳۰ میکروگرم)، آموکسی‌سیلین (۲۵ میکروگرم)، آموکسی‌کلاو (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلاکساسین (۵ میکروگرم)، تریمتوپریم (۵ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ میکروگرم) و ریفامپسین (۵ میکروگرم). برای انجام تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک، همه ۱٤۰ جدایه به‌صورت سطحی روی محیط کشت اختصاصی خود (MRS جامد) کشت داده شدند و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با استفاده از پنس سترون بافاصله در سطح محیط کشت قرار داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور به مدت ۲٤ ساعت قرار داده شدند. بعدازاین مدت، پلیت‌ها برداشته‌شده و قطر هاله‌های عدم رشد مربوط به بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده به‌وسیله خط‌کش کولیس برحسب میلی‌متر اندازه‌گیری شدند و بر اساس قطر هاله‌های عدم رشد، می‌توان میکروارگانسم‌ها را به سه گروه مقاوم (قطر هاله کمتر از ۱ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر هاله ۸-۱ میلی‌متر) و حساس (قطر هاله >۸ میلی‌متر) تقسیم‌بندی کرد (Kiani *et al*., 2021).

- بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها به‌روش چاهک

اثر ضد میکروبی بر اساس انتشار در آگار به‌روش چاهک موردبررسی قرار گرفت (Nitisinprasert *et al*., 2000). بدین‌صورت که ابتدا در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر، OD نمونه‌های بیماری‌زا بین ۲/۳-۲ تنظیم شد تا میزان تقریبی آن‌ها به نیم مک‌فارلند برسد. صد میکرولیتر از باکتری‌های آلوده‌کننده مواد غذایی که از نمونه‌های لبنی پگاه آذربایجان غربی در پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور جداسازی شده بود با سواپ سترون (لوله L شکل) در سطح محیط کشت Mueller Hinton Agar به‌طور یکنواخت کشت سطحی داده شد و به‌منظور نفوذ باکتری در محیط کشت آگاردار به مدت دو ساعت در زیر هود میکروبی قرار داده شدند. سپس با استفاده از لوله موئین سترون، چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر ایجاد شد و۱۰۰ میکرو لیتر از سوپرناتانت سویه‌های با توانایی پروبیوتیکی که از ۲٤ ساعت قبل

واکشت شده بودند، در داخل چاهک‌ها ریخته شد و محیط MRS Broth به‌عنوان کنترل منفی در داخل چاهک قرار داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شدند و بعدازاین مدت قطر هاله‌های عدم رشد با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و بر اساس اندازه قطر هاله‌ها، فعالیت ضد میکروبی سویه‌ها موردبررسی قرار گرفت.

- شناسایی مولکولی سویه‌های اسیدلاکتیک

استخراج DNA از نمونه‌های ۲٤ ساعته کشت داده‌شده در محیط MRS Broth به‌روش CTAB انجام شد. غلظت و کیفیت DNAها با استفاده از دستگاه Nano Drop 1000 اندازه‌گیری شد (Bao *et al*., 2012). سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۱۰ میکرو لیتر (آغازگر هرکدام یک میکرو لیتر، مستر میکس ٤ میکرو لیتر، دی.ان.ای ۰/۵ میکرو لیتر با غلظت یک میکروگرم در میکرو لیتر و آب دو بار تقطیر ۳/۵ میکرو لیتر)، با استفاده از آغازگرهای عمومی با توالی (F: 5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′) و (R: 3′-TAC CTT GTT AGG ACT TCA CC-3′) با دمای ذوب ۵۹ و با اندازه قطعه تکثیری ۱۵۰۰ نوکلئوتید انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با چرخه‌های واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ چرخه با مرحله واسرشته سازی در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و نهایتاً یک مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Haghshenas *et al*., 2017). برای تفکیک قطعات تکثیر یافته، محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از بافر TBE 1X و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید رؤیت شد. DNAها داخل چاهک ژل الکتروفورز به همراه لودینگ بافر (Dye) بارگذاری گردیدند و از DNA Ladder شرکت فرمنتاز به‌عنوان مارکر استفاده شد. درنهایت محصولات PCR زیر نور UV ردیابی شدند. بعد از انجام PCR و تفکیک قطعات تکثیر یافته، به‌منظور مقایسات الگوی برشی سویه‌های موردمطالعه، محصولات PCR با آنزیم‌های برشی *Hhal* و *Hinf –I* به‌طور جداگانه برش داده شدند. اجزای واکنش‌های هضم آنزیمی شامل آنزیم برشی ۰/۵ میکرو لیتر، محصول PCR ۲/۵ میکرو لیتر بعد از خالص‌سازی، بافر یک میکرو لیتر و آب ٦ میکرو لیتر بودند. آنزیم‌های برشی بر اساس جایگاه برشی سایر سویه‌های اسیدلاکتیک موجود در GeneBank انتخاب شد. واکنش‌های هضم به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در بن ماری قرار داده شدند، بعدازاین مدت محصولات هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگارز سه درصد الکتروفورز شد و برای نشان دادن اندازه قطعات برش یافته از 1Kb DNA Ladder استفاده شد. سپس نوارهای حاصل از برش داخل دستگاه ژل‌داک قرار داده شد و زیر نور UV مشاهده و عکس‌برداری انجام شد. با الگوی نواری به‌دست‌آمده باندها، اسکوردهی شدند و سپس با استفاده از نرم‌افزار Mega-X درخت فیلوژنتیکی برای سویه‌های جداشده از ماست‌های سنتی، ترسیم شد. دلیل انتخاب این آنزیم‌ها بررسی الگوی برشی توالی‌های ثبت‌شده گونه‌های لاکتیک اسید در NCBI با استفاده از نرم‌افزار GENEDOC است. محصولات برش با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز شد باندها با الگوی

نواری به‌دست‌آمده، اسکوردهی شدند. با استفاده از نرم‌افزار Mega-X درخت فیلوژنتیکی برای سویه‌های جداشده از ماست‌های سنتی رسم شد.

یافته‌ها

در ابتدا ۱٤۰ ایزوله خالص‌سازی و در گلیسرول ۳۰ درصد در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

- شناسایی مقدماتی جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی

شناسایی اولیه جدایه‌ها با استفاده از تست‌هایی شامل توانایی رشد در دماهای مختلف در مدت‌زمان ۲٤ ساعت انجام و سپس با استفاده از خصوصیات ظاهری کلنی‌ها، شناسایی اولیه صورت گرفت. تمامی سویه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس طی ۲٤ ساعت بهترین رشد را داشتند و در دمای ۱۰ و ٤۵ درجه سلسیوس طی ۲٤ ساعت یا رشد نداشتند یا میزان رشد کمتری را نشان دادند. در رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز، اکثر جدایه‌ها گرم مثبت و کاتالاز منفی از خود نشان دادند.

- تعیین جدایه‌های مقاوم به محیط اسیدی

درصد زنده‌مانی جدایه‌ها در pH ۲/۵ به مدت ۳ ساعت، در جدول (۱) آورده شده است. بر اساس این تقسیم‌بندی هیچ‌کدام از جدایه‌ها حساس به pH ۲/۵ نبودند درحالی‌که پنج جدایه مقاومت متوسط، ۸۱ جدایه مقاومت خوب و ٤ جدایه مقاومت بسیار خوب و ۸ جدایه در OD_{600nm} درصد زنده‌مانی بیشتر از ۱۰۰ را نشان دادند یعنی علاوه بر مقاومت، رشد هم داشتند.

جدول (۱)- تعیین درصد زنده‌مانی سویه‌های جداشده در pH ۲/۵ طی سه ساعت

سویه‌ها	درصد زنده‌مانی	مقاومت به pH۲/۵
هیچ‌کدام از ایزوله‌ها درصد زنده‌مانی کمتر از ۱۰٪ را نشان ندادند	کمتر از ۱۰٪	-
S۲، S۱٤، S۲٤، S۳۵، S٤۱	بین ۱۰٪ و ٦۰٪	مقامت متوسط
S۱، S۲، S۳، S۵، S٦، S۷، S۸، S۱۰، S۱۱، S۱۲، S۱۳، S۱۵، S۱۷، S۱۹، S۲۰، S۲۲، S۲۳، S۲۵، S۲٦، S۲۷، S۲۸، S۲۹، S۳۰، S۳۲، S۳۳، S۳۸، S۳۹، S٤۰، S٤۲، S٤٦، S٤۹، S۵۰، S۵۱، S۵۲، S۵۳، S۵٤، S۵۵، S۵٦، S۵۷، S۵۸، S۵۹، S٦۰، S٦۱، S٦۲، S٦۳، S٦٤، S٦۵، S٦٦، S٦۸، S۷۲، S۷۵، S۷٦، S۷۷، S۷۸، S۷۹، S۸۲، S۸۳، S۸٦، S۸۹، S۹٤، S۹۸، S۹۹، S۱۰۰، S۱۰۲، S۱۰۳، S۱۰٤، S۱۰٦، S۱۰۷، S۱۰۸، S۱۱٤، S۱۱٦، S۱۱۷، S۱۱۹، S۱۲٤، S۱۲۵، S۱۲۹، S۱۳۰، S۱۳۱، S۱۳۱، S۱۳۳، S۱۳۵، S۱۳۸	بین ۶۰٪ و ۸۰٪	مقاومت خوب
S٤، S۹، S۱٦، S۱۸، S۲۱، S۳۱، S۳٦، S۳۷، S٤۳، S٤٤، S٤۵، S٤۷، S٤۸، S٦۷، S۷۰، S۷۱، S۷۳، S۸۰، S۸۱، S۸۵، S۸۷، S۹۰، S۹۲، S۹۳، S۹۵، S۹٦، S۹۷، S۱۰۱، S۱۰۵، S۱۱۰، S۱۱۱، S۱۱۲، S۱۱۳، S۱۱۵، S۱۲۰، S۱۲۲، S۱۲۳،۱۲۷، S۱۲۸، S۱۳۲، S۱۳٤، S۱۳٦، S۱۳۷، S۱۳۹، S۱٤۰	بین ۸۰٪ و ۱۰۰٪	مقاومت بسیار خوب
S۳٤، S۸٤، S۸۸، S۹۱، S۱۰۹، S۱۱۸، S۱۲۱، S۱۲٦	بیشتر از ۱۰۰٪	علاوه برمقاومت رشد هم داشته

- تعیین جدایه‌های مقاوم به نمک صفراوی

نتایج و درصد زنده‌مانی جدایه‌های موردمطالعه در نمک صفراوی ۰/۳ درصد طی سه ساعت در جدول (۲) نشان داده‌شده است.

جدول (۲)- تعیین درصد بقا جدایه‌های مورد مطالعه بر اساس مقاومت به نمک‌های صفراوی

سویه‌های موردمطالعه	درصد زنده‌مانی	مقاومت به نمک صفراوی ۰/۳ درصد
S۹۸	کمتر از ۱۵٪	-
S۱٤، S۳٦، S۳۷، S۳۸، S۳۹، S٤۰، S٤۲، S٤۳، S٤٤، S٤٦، S٤۸، S٤۹، S۵۰، S۵۱، S۵۹، S٦۰، S٦۱، S٦۳، S٦٤، S٦۷، S۷۰، S۷۱، S۷۳، S۷٤، S۷۵، S۷٦، S۸۰، S۸۱، S۸۲، S۹۰، S۱۰۱، S۱۰٤، S۱۰۷، S۱۰۹، S۱۱۰، S۱۱۲، S۱۱۳، S۱۱٤، S۱۱۷، S۱۲۲، S۱۳۶، S۱۳۸	بین ۱۵٪ و ٤۰٪	ضعیف
S۹، S۱۷، S۲٦، S۳۰، S۳۲، S۳۳، S۳٤، S۳۵، S٤۱، S٤۷، S٦۲، S٦۵، S٦۸، S٦۹، S۷۷، S۷۸، S۹۵، S۱۰۰، S۱۰۲، S۱۰۳، S۱۱۵، S۱۱٦، S۱۱۸، S۱۲۰، S۱۲٤، S۱۲۵، S۱۲۷، S۱۳۹	بین ٤۰٪ و ٦۰٪	مقاوم
S۱، S۲، S٤، S۵، S٦، S۷، S۸، S۱۰، S۱۱، S۱۲، S۱۳، S۱۵، S۱٦، S۱۸،۱۹، S۲۰، S۲۱، S۲۲، S۲۳، S۲٤، S۲۵، S۲۷، S۲۹، S۳۱، S٤۵، S۵۲، S۵۳، S۵٤، S۵۵، S۵٦، S۵۷، S۵۸، S٦٦، S۷۲، S۷۹، S۸۳، S۸٤، S۸۵، S۸٦، S۸۷، S۸۸، S۸۹، S۹۱، S۹۲، S۹۳، S۹٤، S۹۷، S۹۹، S۱۰۵، S۱۰٦، S۱۰۸، S۱۱۱، S۳، S۱۲۱	بین ٦۰٪ و ۱۰۰٪	مقاومت بالا
	بیشتر از ۱۰۰٪	مقاومت بالا+رشد

- تعیین جدایه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک

بر اساس نتایج قطر هاله‌های عدم رشد، میزان حساسیت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مورداستفاده به‌صورت مقاوم، نیمه حساس و حساس گزارش شدند. سویه S۱۰۷ به همه ده آنتی‌بیوتیک موردمطالعه مقاومت نشان داد و سویه‌های S۲۰ و S۱۳٦ به همه آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه در این تحقیق حساسیت نشان دادند. تقسیم‌بندی همه‌ی سویه‌های موردمطالعه بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در جدول (۳) گزارش‌شده است.

همچنین از بین آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه، آموکسی کلاو (AMC_{30}) با حساسیت به ۱۲۹ سویه‌ی موردمطالعه بهترین عملکرد را نشان داد. بعدازآن به ترتیب آموکسی‌سیلین (AMX_{25}) ۱۱٤ سویه، ریفامپیسین (RA_5) ۱۰۵ سویه، آمیکاسین (AN_{30})۱۰۳ سویه، اریترومایسین (E_{15}) ۹۸ سویه، سیپروفلوکساسین (CP_5) ۹۸ سویه، ونکومایسین (V_{30}) ۹۳ سویه، نئومایسین

(N_{30}) ٦٨ ســـویه، تریمتوپریم (TMP_{59}) ٥٩ ســـویه و پنی‌سیلین (P_{10}) ١٨ سویه حساسیت نشان دادند.

جدول (٣)- تقسیم‌بندی جدایه‌های موردمطالعه بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها

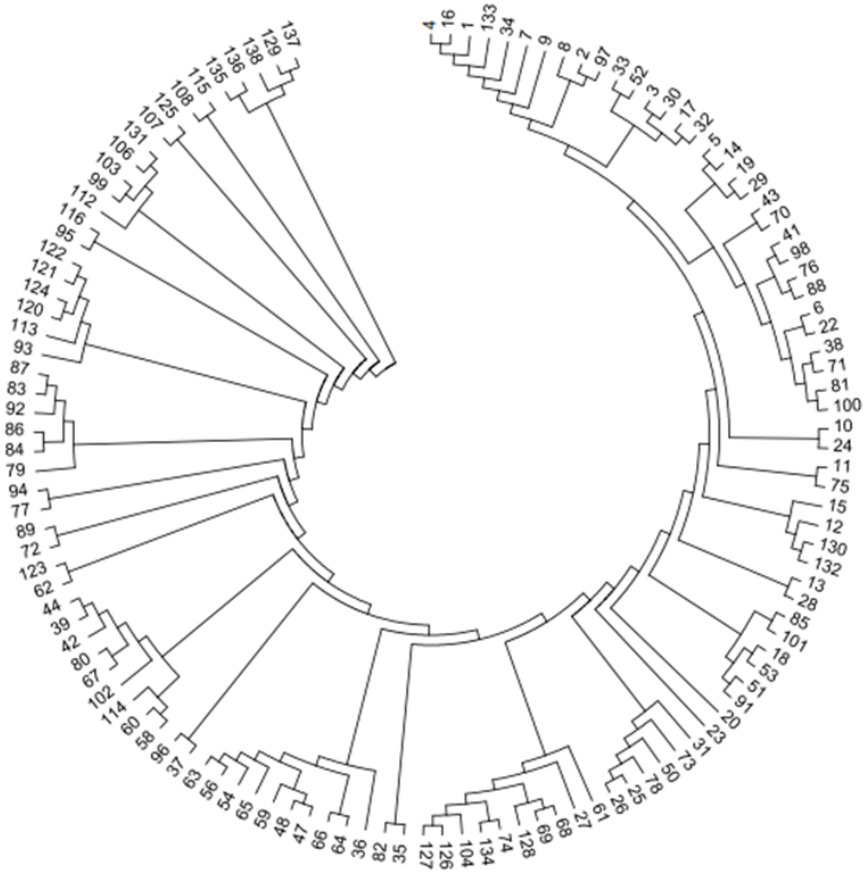
سویه‌های موردمطالعه	مقاومت سویه‌ها
S٥، S١٩، S٢٣، S٢٤، S٦١، SV٤، S٨٣، S١١٠، S١١١، S١٣١، S١٣٧	مقاوم به ١ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٩ آنتی‌بیوتیک
S١، S٣، S١٦، S١٧، S١٨، S٢٢، S٣٣، S٤٢، S٤٣، S٥٣، S٥٥، S٥٧، S٥٨، S٦٠، S٦٦، S٦٧، S٦٩، SV١، S١٠٤، S١٠٨، S١٢٠، S١٢١، S١٢٢، S١٢٥، S١٢٦، S١٢٩، S١٣٤، S١٣٥	مقاوم به ٢ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٨ آنتی‌بیوتیک
S٤، S٦، S٨، S١٠، S١٤، S٢٥، S٢٨، S٣١، S٣٢، S٣٥، S٣٧، S٤٠، S٤١، S٤٤، S٥٠، S٥١، S٥٦، S٦٢، S٦٣، S٦٤، SV٥، SV٦، SV٧، S٨٤، S٩٤، S٩٦، S٩٧، S٩٩، S١١٧، S١٢٣، S١٣٣، S١٣٨، S١٤٠	مقاوم به ٣ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٧ آنتی‌بیوتیک
S٩، S٢٦، S٢٧، S٤٥، S٤٦، S٥٤، S٥٩، S٦٥، SV٩، S٨١، S٨٢، S٨٦، S٨٧، S٨٨، S٨٩، S٩٠، S٩٣، S٩٥، S١٠٠، S١٠٥، S١٠٦، S١١٤، S١٢٤، S١٢٧، S١٢٨، S١٣٠، S١٣٩	مقاوم به ٤ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٦ آنتی‌بیوتیک
S٢، S١١، S١٢، S١٥، S٢٩، S٣٠، S٣٦، S٣٨، S٣٩، SV٣، SV٨، S٨٠، S٨٥، S١٠١، S١١٢	مقاوم به ٥ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٥ آنتی‌بیوتیک
S٣٤، S٤٩، S٩٢، S١١٩	مقاوم به ٦ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٤ آنتی‌بیوتیک
S٢١، S٤٨، S٦٨، SV٠، S٩١، S١٠٢، S١٠٣	مقاوم به ٧ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٣ آنتی‌بیوتیک
S٤٧، S٥٢، S١١٥، S١١٦	مقاوم به ٨ آنتی‌بیوتیک و حساس به ٢ آنتی‌بیوتیک
S٧، S٩٨، S١٠٩، S١١٣، S١١٨، S١٣٢	مقاوم به ٩ آنتی‌بیوتیک و حساس به ١ آنتی‌بیوتیک

- تعیین جدایه‌های دارای فعالیت ضدمیکروبی

نتایج فعالت ضدمیکروبی سویه‌های لاکتیک اسید مورد مطالعه نشان داد سویه‌های S١٢، S١٠٠ و S١٠٢ علیه ٧ میکروارگانیسم بیماری‌زای غذایی و S٦١، S٦٢، S٩٣، S٩٤، S٩٥، S٩٦، S١٠٣ علیه ٦ میکروارانیسم بیماری‌زای غذایی به‌عنوان مؤثرترین سویه‌ها علیه آلوده‌کننده‌های غذایی و سویه‌های S١، S٢، S٦، S٢٠، S٢١، S٢٢، S٢٦، S٢٧، S٢٨، S٣٦، S٣٩، S٤٠، S٤١، S٥٣، S٥٩، S٦٠، SV٧، S٨٥، S٨٦، S٨٧، S٨٨، S١٠٤، S١١٣، S١٢٨، S١٣٩، S١٤٠ به‌عنوان کم اثرترین سویه‌ها علیه میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی بودند که هیچ تأثیری نشان ندادند.

- شناسایی مولکولی نمونه‌های اسیدلاکتیک

نتایج حاصل ازPCR نشان داد همه‌ی جدایه‌های مورد آزمایش باندی در محدوده ١٥٠٠ جفت نوکلئوتید (bp) و به‌صورت تک باندی نشان دادند. شکل (١) درخت فیلوژنتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار سویه‌های جداسازی شده از فرآورده‌های شیر سنتی به ٢٥ گروه تقسیم‌بندی شدند.



شکل (۱)- درخت فیلوژنتیکی برای گروه‌بندی ۱۴۰ جدایه‌های لاکتوباسیلوس موردمطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه حاکی از آن است که همه‌ی ۱۴۰ جدایه موردمطالعه در این تحقیق تحمل خوبی در pH ۲/۵ در مدت‌زمان سه ساعت نشان دادند و ۸ ایزوله علاوه بر مقاومت در محیط اسیدی رشد نیز داشته‌اند. محققین در مطالعه‌ای نشان دادند که سویه‌های پروبیوتیک مورد آزمایش در شرایط اسیدی با pH ۲ و ۳ pH قابلیت زنده‌مانی داشتند و می‌توانند به‌عنوان کاندیدهای بالقوه پروبیوتیک برای مطالعات بیشتر انتخاب شوند (Xu *et al*., 2020). در مطالعات دیگر نشان داده شد که سویه *Lactobacillus sakei* GM3 جداشده از شیر بز تحمل بهتری را در pH ۳ نسبت به pH ۲/۵ نشان می‌دهد (Avaiyarasi *et al*., 2016).

در این مطالعه همه سویه‌های موردمطالعه به‌جز S۹۸ در حضور نمک صفراوی طی مدت ۳ ساعت مقاومت نشان دادند و دو تا از سویه‌ها علاوه بر مقاومت رشد نیز داشتند. یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد که سویه جداشده‌ی *Lactobacillus sakei* GM3 از شیر بز در نمک صفراوی ۱ درصد و ۲ درصد هیچ‌گونه کاهش رشد قابل‌توجهی را نشان نداد که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مشابهت دارد (Avaiyarasi *et al*., 2016).

باکتری‌های اسیدلاکتیک ممکن است به‌صورت مخازن ذاتی یا خارجی برای ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک عمل کند، که نوع دوم می‌تواند از طریق زنجیره غذایی به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا منتقل شود. کمیته علمی تغذیه حیوانات اروپا و سازمان ایمنی غذایی اروپا توصیه می‌کنند که سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک که به‌طور روزانه مصرف می‌شوند بایستی فاقد ژن‌های مقاومت ضد میکروبی اکتسابی یا قابل‌انتقال باشند و برای مصرف انسان و حیوان بی‌خطر تلقی شوند. چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که برخی از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مقاومت ذاتی در برابر Bacitracin، Kanamycin، Ticoplanin، Vancomycin، Ciprofloxacin، و Cefoxitin دارند (Xu *et al.*, 2020). در این تحقیق بر اساس اندازه‌گیری قطر هاله‌های عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک سویه‌های S۲۰ و S۱۳٦ به همه آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه در این تحقیق حساسیت نشان دادند.

مطالعات متعدد به نقش باکتری‌های پروبیوتیک جداشده از محصولات لبنی علیه باکتری‌های بیماری‌زا اشاره داشته‌اند. نتایج این تحقیقات تأییدی بر نتایج تحقیق حاضر در مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا توسط سویه‌های لاکتوباسیل از ماست‌های سنتی بود. به همین منظور در این تحقیق به بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های جداشده‌ی موردمطالعه علیه ۱۲ پاتوژن غذایی پرداخته شد که نتایج حاصل نشان داد که اکثر سویه‌ها به‌خوبی توانایی مهار رشد سویه‌های بیماری‌زا را داشته‌اند. فعالیت ضد میکروبی سویه‌ی پروبیوتیک در تحقیقی موردبررسی قرار گرفت، محققین با استفاده از روش چاهک نشان دادند لاکتوباسیل‌ها که از پروبیوتیک‌ها هستند از رشد باکتری *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، و *Yersinia enterocolitica* جلوگیری می‌کنند (Ogunbanwo *et al.*, 2003). نتایج تحقیقی، اثر ضد میکروبی برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس مانند *L. paracasei* M18-1، *L. paracasei* Y8-1 و *L. plantarum* M19-1 را علیه *Shigella* و *S. sonnei* گزارش نمود (Mirzaei *et al.*, 2018).

برای شناسایی دقیق‌تر سویه‌های پروبیوتیک و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا استفاده‌شده در این مطالعه از تکثیر ژن *16s rRNA* و تکنیک ARDRA استفاده شد. روش ARDRA توصیف‌شده در این مطالعه با موفقیت در بین سویه‌های مختلف پروبیوتیک جداشده از ماست‌های سنتی از مناطق مختلف ایران و همچنین میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای غذایی موردبررسی قرار گرفت. به‌طورکلی ARDRA یک روش سریع و کارآمد برای غربالگری انواع مختلف باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. در این مطالعه با تجزیه‌وتحلیل ARDRA از تمام جدایه‌های آزمایش‌شده و همچنین از دو آنزیم محدودکننده *Hinf-I* و *Hhal* برای برش ژن *16s rRNA* استفاده شد و به‌علت زیاد بودن تعداد نمونه‌های موردبررسی، سویه‌های با الگوی برشی متفاوت گروه‌بندی شدند.

با توجه به نتایج مطالعه می‌توان به این نتیجه رسید که در بین سویه‌های آزمایش‌شده، دوسویه‌ی S۲۰ و S۱۳٦ به همه آنتی‌بیوتیک‌های موردمطالعه حساس بودند. همچنین سویه‌های S۱۲، S۱۰۰ و S۱۰۲ دارای بیشترین فعالیت ضد میکروبی بودند. از آن‌جایی‌که

سویه‌های مذکور تحمل خوبی به شرایط اسیدی معده و نمک صفراوی روده داشتند، می‌توان آن‌ها را به‌عنوان سویه‌های با توانایی پروبیوتیکی برای مقاصد ضد میکروبی در فرآورده‌های شیر و مواد غذایی استفاده نمود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نویسندگان تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده بیوتکنولوژی صنایع غذایی تبریز به خاطر همکاری در تأمین هزینه‌های موردنیاز و به سرانجام رساندن این پروژه اعلام می‌دارند.

منابع

- Alizadeh, A. M., Hashempour-Baltork, F., Alizadeh-Sani, M., Maleki, M., Azizi-Lalabad, M., and Khosravi-Darani, K. (2020). Inhibition of *Clostridium botulinum* and its toxins by probiotic bacteria and their metabolites: an update review. Quality Assurance and Safety of Crops and Foods, 12: 59-68.
- Aponte, G., Mancilla, C., Carreazo, N. and Galarza, R. (2013). Probiotics for treating persistent diarrhea in children. Cochrane Database of Systematic Reviews, 8: 1-18.
- Avaiyarasi, N., Ravindran, A., Venkatesh, P. and Arul, V. (2016). *In vitro* selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. Food Control, 69: 124-133.
- Bao, Q., Liu, W., Wang, W., Qing, M., Chen, X. and Zhang, H. (2012). Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional yak milk products of Gansu Province in China. The Journal of General and Applied Microbiology, 58(2): 95-105.
- Cantón, E., Espinel-Ingroff, A. and Pemán, J. (2009). Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. Expert Review of Anti-infective Therapy, *7*(1): 107-119.
- Chateau, N., Deschamps, A. and Sassi, A. (1994). Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. Letters in Applied Microbiology, 18(1), 42-44.
- Haghshenas, B., Nami, Y., Almasi, A., Abdullah, N., Radiah, D., Rosli, R., et al. (2017). Isolation and characterization of probiotics from dairies. Iranian Journal of Microbiology, 9(4): 234.
- Kermanshahi, R. and Peymanfar, S. (2012). Isolation and identification of *lactobacilli* from cheese, yoghurt and silage by *16S rDNA* gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. Microbiology, 5(4): 528-532. [In Persian]
- Kiani, A., Nami, Y., Hedayati, S., Jaymand, M., Samadian, H. and Haghshenas B. (2021). Tarkhineh as a new microencapsulation matrix improves the quality and sensory characteristics of probiotic *Lactococcus lactis* KUMS-T18 enriched potato chips. Scientific Reports, 11(1): 1-13.
- Kiani, A., Nami, Y., Hedayati, S., Komi, D., Goudarzi, F. and Haghshenas B. (2021). Application of Tarkhineh fermented product to produce potato chips with strong probiotic properties, high shelf-life, and desirable sensory characteristics. Frontiers in Microbiology, 12: 1-13.

- Kumar, D., Rejitha, R., Devika, S., Balakumaran, M., Rebecca, A. and Kalaichelvan, P. (2012). Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus sp*. MPTK 912 isolated from oil mill effluent. Advances in Applied Science Research, 3(2): 930-938.
- Mirzaei, E., Lashani, E. and Davoodabadi, A. (2018). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from traditional yogurt and milk against *Shigella* strains. GMS Hygiene and Infection Control, 13: 1-5.
- Moradi, M., Kousheh, S. A., Almasi, H., Alizadeh, A., Guimarães, J. T., Yılmaz, N., and Lotfi, A. (2020). Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 19(6): 3390-3415.
- Narimani, T., Tarinejad, A., and Hejazi, M. A. (2015). Isolation and biochemical and molecular identification of *Lactobacillus* bacteria with probiotic potential from traditional cow milk and yogurt of Khoi city. Journal of Food Science and Technology, 12(48): 113-126. [In Persian]
- Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. and Sonomoto, K. (2000). Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella sp*. resistant to antibiotics. Agriculture and Natural Resources, 34(3): 387-400.
- Ogunbanwo, S., Sanni, A. and Onilude, A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. African Journal of Biotechnology, 2(8): 219-227.
- Ortolani, M. B. T., Yamazi, A. K., Moraes, P. M., Vicosa, G. N., and Nero, L. A. (2010). Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp*., and *Staphylococcus aureus*. Foodborne Pathogens and Disease, *7*(2): 175-180.
- Ouiddir, M., Bettache, G., Salas, M., Pawtowski, A., Donot, C., Brahimi, S., et al. (2019). Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. Food Microbiology, 82: 160-170.
- Ramos Pereira, J., Mareze, J., Fernández, D., Rios EA, Santos, J. and López Díaz, TM. (2021). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from milk against *Penicillium commune*, *P. nordicum*, and *P. verrucosum*. International Journal of Food Microbiology, 355: 109331.
- Shehata, M., Badr, A., El Sohaimy, S., Asker, D. and Awad, T. (2019). Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. Annals of Agricultural Sciences, 64(1): 71-78.
- Xu, Y., Zhou, T., Tang, H., Li, X., Chen, Y., Zhang, L., et al. (2020). Probiotic potential and amylolytic properties of lactic acid bacteria isolated from Chinese fermented cereal foods. Food Control, 111: 107057.