



Research Paper

Evaluation of Antimicrobial and Anti-Biofilm activities of *Lactobacillus* Species isolated from Kefir Against Foodborne Pathogens *Staphylococcus Aureus* and *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium

Maryam Ghane^{1*}, Parisa Ataellahi Eshkoo², Ashkan Kazemi²

¹Department of Biology, IsI.C., Islamic Azad University, Islamshahr, Iran

²R&D Department, Danesh Pazhohan Zistyar Co., Tehran, Iran

Received: 09/06/2025, Accepted: 28/07/2025

Abstract

Kefir, as a fermented dairy product, contains a variety of probiotic microorganisms, including *Lactobacillus* species, which have high potential in combating foodborne pathogens. The aim of this study was to isolate and identify *Lactobacillus* species from kefir and to evaluate their antibacterial and anti-biofilm activities against *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium). *Lactobacillus* isolates were obtained from kefir samples and identified using microbiological methods and molecular identification based on 16S rRNA gene sequencing. The antibacterial activity of the isolates was assessed using the well diffusion method. In addition, the ability to inhibit biofilm formation was evaluated using the crystal violet staining assay. Molecular identification results revealed that the isolates belonged to *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei*. In the antibacterial assay, the isolates produced average inhibition zone diameters of 14.2 ± 1.8 mm against *Staphylococcus aureus* and 12.6 ± 2.1 mm against *Salmonella* Typhimurium. In the biofilm inhibition assay, the maximum inhibition percentages were 68% for *S. aureus* and 61% for *S. Typhimurium*. These findings indicated that some *Lactobacillus* isolates had significant inhibitory effects on the growth and biofilm formation of these pathogenic bacteria. Accordingly, native *Lactobacillus* species found in kefir may be considered effective biocontrol agents for managing foodborne contamination.

Keywords: *Lactobacillus*, kefir, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, antibiofilm, antibacterial

Citation: Ghane M, Ataellahi Eshkoo P, Kazemi A, Evaluation of antimicrobial and anti-Biofilm activities of *Lactobacillus* Species isolated from kefir against foodborne pathogens *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Quality and Durability of Agricultural Products and Food Staffs*, 2025; 4(4):49-63.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1209425>



© The Author(s) **Publisher:** Islamic Azad University of Kerman, Iran

*Corresponding author: Maryam Ghane, Email: ma.ghane@iau.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

The increasing threat of antibiotic-resistant foodborne pathogens and the limitations of chemical preservatives in food safety have emphasized the need for natural, effective biocontrol strategies. Kefir, a traditional fermented beverage made from kefir grains, harbors a complex symbiotic community of yeasts and lactic acid bacteria (LAB), particularly *Lactobacillus* species. These bacteria are renowned for their probiotic properties and their ability to produce antimicrobial compounds such as lactic acid, hydrogen peroxide, and bacteriocins. In addition to inhibiting pathogen growth, certain *Lactobacillus* strains exhibit the unique ability to disrupt or prevent the formation of biofilms structured microbial communities that are notoriously resistant to antibiotics and disinfectants. The present study aims to isolate and identify *Lactobacillus* strains from kefir and evaluate their antimicrobial and antibiofilm activity against two major foodborne pathogens: *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Typhimurium*.

Methods

10 grams of commercial kefir grains were fermented in sterilized milk, and serial dilutions were cultured on MRS agar under anaerobic conditions. Colonies were selected based on morphology and further screened for catalase activity, Gram staining, and rod-shaped appearance to confirm their identity as *Lactobacillus*. 10 isolates were preserved and subjected to functional characterization. The antimicrobial activity of the isolates was evaluated using the well diffusion method on Mueller-Hinton agar against *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* ATCC 14028. Supernatants from 24-hour *Lactobacillus* cultures were sterilized and added to wells inoculated with each pathogen. The inhibition zones were

measured after 24-hour incubation at 37°C. Antibiofilm activity was assessed using the crystal violet microplate assay. Pathogens were co-incubated with sterile *Lactobacillus* supernatants in 96-well plates for 24 hours. After biofilm fixation and staining, optical density at 590 nm was measured to calculate the percentage inhibition relative to control wells. Molecular identification of the most effective strains was performed using 16S rRNA gene sequencing. Genomic DNA was extracted, amplified via PCR, and sequenced. Sequences were analyzed using BLAST and phylogenetic relationships were constructed with MEGA software. Carbohydrate fermentation patterns were determined using phenol red-based sugar fermentation assays for a range of sugars (e.g., glucose, fructose, lactose, maltose, mannitol, etc.).

Results and Discussion

A total of 23 bacterial isolates were recovered from kefir, of which 10 were confirmed as catalase-negative, Gram-positive rods indicative of *Lactobacillus*. These isolates displayed typical creamy-white, moist colony morphologies on MRS agar. All isolates exhibited inhibitory activity against both pathogens, although with varying efficacy. The inhibition zone diameters ranged from 11.6 to 17.1 mm for *S. aureus* and from 9.2 to 15.9 mm for *S. Typhimurium*. Strain Lb7 demonstrated the highest antimicrobial activity against both pathogens, with significantly larger inhibition zones ($p < 0.01$). Strains Lb4 and Lb6 also showed strong antagonistic activity. All isolates showed the capacity to reduce biofilm formation by the tested pathogens. The highest inhibition was observed for Lb7 (63.3% for *S. Typhimurium*, 62.1% for *S. aureus*) and Lb4 (59.9% and 60.4%, respectively). In contrast, Lb5 and Lb8 showed significantly lower biofilm inhibition (below 45%). Most strains exhibited comparable antibiofilm activity against both pathogens, although Lb3 and Lb9

showed a statistically significant difference in efficacy between the two. Four highly active strains (Lb4, Lb6, Lb7, and Lb10) were selected for 16S rRNA gene sequencing. BLAST analysis confirmed that these strains belonged to *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei*. Phylogenetic trees confirmed their taxonomic placement within the genus *Lactobacillus*. The selected isolates exhibited diverse carbohydrate fermentation patterns. Lb4 showed the broadest metabolic capacity, fermenting all tested sugars. This metabolic versatility could contribute to its effective colonization and antagonistic activity in diverse environments. This study demonstrated the potent antimicrobial and antibiofilm properties of *Lactobacillus* strains isolated from kefir. These results support previous findings highlighting the inhibitory effects of LAB-derived metabolites against foodborne pathogens. Notably, the efficacy was higher against the Gram-positive *S. aureus*, likely due to the absence of an outer membrane that limits antimicrobial penetration in Gram-negative bacteria. Differences in biofilm inhibition among isolates suggest variation in the production of bioactive compounds such as organic acids, biosurfactants, hydrogen peroxide, and bacteriocins. The high efficacy of Lb7 and Lb4 marks them as promising candidates for applications in food preservation and safety. Moreover, the use of molecular tools allowed accurate species-level identification, enhancing reproducibility and potential regulatory acceptance for future applications. The study also highlights the advantages of targeting biofilm formation often a major contributor to chronic contamination and resistance rather than focusing solely on planktonic bacterial inhibition. This dual-action capability (antimicrobial and antibiofilm) makes certain *Lactobacillus* strains particularly valuable as natural biopreservatives.

Conclusion

The findings of this study underscore the significant potential of kefir-derived *Lactobacillus* strains, particularly *L. rhamnosus* and *L. paracasei*, in inhibiting the growth and biofilm formation of major foodborne pathogens. Their natural origin, probiotic benefits, and efficacy against resistant microbial structures like biofilms highlight their applicability as safe and effective alternatives to chemical preservatives in food systems. Future research should explore formulation, safety evaluation, and in vivo efficacy to fully harness these strains in industrial and clinical settings.

Keywords: *Lactobacillus*, kefir, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, antibiofilm, antibacterial

Funding: There was no external funding in this study.

Authors' contribution: All authors contributed equally to the writing and preparation of this manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.



ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از کفیر علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی / استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم

مریم قانع^{۱*}، پریسا عطا الهی اشکور^۲، اشکان کاظمی^۲

^۱ گروه زیست‌شناسی، واحد اسلامشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، اسلامشهر، ایران

^۲ بخش تحقیق و توسعه، شرکت دانش‌پژوهان زیست‌یار، تهران، ایران

دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۰۴ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۱

چکیده

کفیر به عنوان یک فرآورده تخمیری لبنی، دارای میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک متنوعی از جمله گونه‌های لاکتوباسیلوس است که پتانسیل بالایی در مقابله با عوامل بیماری‌زای غذایی دارند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی گونه‌های لاکتوباسیلوس از کفیر و بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی آن‌ها علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا انتریکا* سرووار تیفی موریوم (*سالمونلا* تیفی موریوم) بود. جدایه‌های لاکتوباسیلوس از نمونه‌های کفیر جداسازی شدند و شناسایی آن‌ها با استفاده از روش‌های میکروبیولوژیک و شناسایی مولکولی بر اساس توالی‌یابی ژن 16 SrRNA انجام شد. فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌ها با استفاده از روش انتشار در چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین برای توانایی مهار بیوفیلیم، از آزمون رنگ‌آمیزی کریستال و بوله استفاده گردید. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که جدایه‌ها به گونه‌های لاکتوباسیلوس *رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پاراکازنی* تعلق دارند. در آزمون ضدباکتریایی، جدایه‌ها میانگین قطر هاله عدم رشد برابر با $14/2 \pm 1/8$ میلی‌متر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و $12/6 \pm 2/1$ میلی‌متر علیه *سالمونلا* تیفی موریوم ایجاد کردند. در بررسی مهار تشکیل بیوفیلیم، حداکثر درصد مهار به ترتیب برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی موریوم برابر با ۶۸٪ و ۶۱٪ بود. یافته‌ها نشان داد که برخی از جدایه‌های لاکتوباسیلوس دارای اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر رشد و تشکیل بیوفیلیم این باکتری‌های بیماری‌زا بودند. بر این اساس، گونه‌های بومی لاکتوباسیلوس موجود در کفیر می‌توانند به عنوان عوامل زیستی مؤثر در کنترل آلودگی‌های غذایی مطرح شوند.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، کفیر، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا تیفی موریوم، ضدبیوفیلیم، ضدباکتریایی

استناد: مریم قانع، پریسا عطا الهی اشکور، اشکان کاظمی، ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و ضدبیوفیلمی گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از کفیر علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی / استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، کیفیت و ماندگاری تولیدات کشاورزی و مواد غذایی، (۱۴۰۴)، دوره ۴، شماره ۴، صفحات ۴۹-۶۳.

DOI: <https://doi.org/10.71516/qafj.2025.1209425>



مقدمه

کفیر، نوشیدنی تخمیری حاصل از دانه‌های کفیر، به دلیل خواص سلامت‌بخش فراوان، در سال‌های اخیر مورد توجه محققان و متخصصان صنایع غذایی قرار گرفته است. دانه‌های کفیر حاوی مجموعه‌ای پیچیده از مخمرها و باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که به‌طور همزیست در ماتریکسی پروتئینی-پلی‌ساکاریدی زندگی می‌کنند (۱). در میان این میکروارگانیسم‌ها، جنس *لاکتوباسیلوس* جایگاه ویژه‌ای دارد. اعضای این جنس با تخمیر لاکتوز، اسیدلاکتیک و ترکیبات زیستی دیگر مانند پراکسید هیدروژن، دی‌استیل و همچنین باکتریوسین تولید می‌کنند (۲). این ترکیبات، زمینه را برای مهار رشد پاتوژن‌ها، تنظیم فلور میکروبی روده، و تحریک پاسخ ایمنی فراهم می‌کنند (۳). یکی از ویژگی‌های کلیدی باکتری‌های پروبیوتیک به‌ویژه *لاکتوباسیل*‌ها، توانایی مهار یا تخریب بیوفیلم است. بیوفیلم ساختاری پیچیده از میکروارگانیسم‌هاست که در ماتریکس خارج‌سلولی محاط شده‌اند و بر روی سطوح زنده یا غیرزنده چسبیده‌اند. این ساختار می‌تواند میکروارگانیسم‌ها را تا هزار برابر در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضدعفونی‌کننده مقاوم‌تر سازد (۴). به همین دلیل، بیوفیلم‌ها عامل مهمی در مزمن شدن عفونت‌ها، پایداری در محیط و آلودگی‌های غذایی هستند. گزارش‌ها نشان داده‌اند که برخی سویه‌های *لاکتوباسیل* با ترشح آنزیم‌ها، اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها، توانایی مهار تشکیل بیوفیلم یا تجزیه آن را دارا هستند (۵). در این زمینه، پاتوژن‌های غذازاد مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* / *نتریکا* سروار تیفی‌موریوم (*سالمونلا* تیفی‌موریوم) به دلیل توانایی بالا در تشکیل بیوفیلم و مقاومت در برابر درمان‌ها، نگرانی‌های قابل‌توجهی را در ایمنی مواد غذایی ایجاد کرده‌اند. *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از عوامل اصلی مسمومیت‌های غذایی ناشی از مصرف محصولات لبنی، گوشت و تخم‌مرغ است و از طریق تولید انتروتوکسین‌های مقاوم به حرارت باعث بروز علائم گوارشی شدید در انسان می‌شود (۶). این باکتری با بهره‌گیری از سیستم‌های تنظیم ژنی، به راحتی بیوفیلم تشکیل داده و به‌ویژه در سطوح خطوط فرآوری غذا یا تجهیزات پزشکی، موجب عفونت‌های مزمن می‌گردد (۷). از سوی دیگر، *سالمونلا* تیفی‌موریوم یکی از گونه‌های

پرخاطر در بین *سالمونلا*‌ها، از طریق مواد غذایی خام یا حرارت ندیده مانند گوشت، مرغ و تخم‌مرغ انتقال می‌یابد و عامل گاستروانتریت‌های شدید است (۸). این باکتری نیز با استفاده از ساختارهای بیوفیلمی، توانایی بقا در شرایط محیطی سخت، مقاومت در برابر شوینده‌ها و چسبندگی به سطوح زنده یا غیرزنده را داراست (۹). با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این دو پاتوژن و محدودیت استفاده از ترکیبات شیمیایی در صنایع غذایی، استفاده از ترکیبات زیستی به‌ویژه *لاکتوباسیل*‌های جداشده از کفیر، می‌تواند راهکار مؤثری برای مهار رشد و حذف بیوفیلم پاتوژن‌ها باشد. جنبه نوآورانه مطالعه حاضر در آن است که به‌جای تمرکز صرف بر فعالیت ضدباکتریایی *لاکتوباسیل*‌ها، بر توانایی آن‌ها در مهار یا حذف بیوفیلم‌های تشکیل‌شده توسط پاتوژن‌های غذازاد متمرکز شده است؛ ویژگی که به مراتب از نظر کاربرد صنعتی و بالینی اهمیت بیشتری دارد. بنابراین، هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های *لاکتوباسیل* از کفیر و بررسی توانایی ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی آن‌ها علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی‌موریوم به‌عنوان پاتوژن‌های شاخص غذازاد با تأکید بر پتانسیل استفاده از این سویه‌ها به‌عنوان جایگزین طبیعی آنتی‌بیوتیک‌ها در صنایع غذایی می‌باشد.

روش کار

میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه

برای جداسازی *لاکتوباسیل*‌ها، مقدار ۱۰ گرم دانه کفیر تهیه‌شده از شرکت کفیرنوش (ایران) به ۲۰۰ میلی‌لیتر شیر استریل‌شده افزوده و در دمای ۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از پایان دوره تخمیر، دانه‌های کفیر با استفاده از صافی استریل جداسازی شده و با ۹۰ میلی‌لیتر محلول فیزیولوژیک استریل حاوی ۰/۹٪ کلرید سدیم و ۰/۱٪ CaCl_2 (Difco Laboratories) همگن‌سازی شدند. سپس رقت‌های متوالی از سوسپانسیون همگن‌شده در محلول فیزیولوژیک تهیه و بر روی محیط کشت MRS^1 (مرک، آلمان) به‌صورت پخش سطحی کشت داده شد. پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی (Gaspak EZ, Difco) در

¹ Man, Rogosa and Sharpe

بررسی خاصیت ضد بیوفیلمی ایزوله‌های جدا شده

برای بررسی توانایی ایزوله‌های لاکتوباسیل در مهار تشکیل بیوفیل، از روش میکروپلیت ۹۶ خان‌های با رنگ کریستال ویوله استفاده شد. در این روش، سوسپانسیونی از باکتری‌های پاتوژن در محیط تریپتیک سوی برات (مرک، آلمان) حاوی ۱٪ گلوکز تهیه و به هر چاهک از پلیت ۹۶ خان‌های به مقدار ۱۸۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از سوپرناتانت استریل شده‌ی ایزوله‌های لاکتوباسیل نیز به آن اضافه گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند (۱۲). پس از انکوباسیون، محتویات هر چاهک خارج و با بافر فسفات سالین سه بار شست‌وشو داده شد. سپس بیوفیلیم تشکیل شده با ۲۰۰ میکرولیتر متانول تثبیت و پس از خشک شدن، با رنگ کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. پس از شست‌وشو و خشک شدن، رنگ متصل شده با ۳۳٪ اسید استیک استخراج و جذب نوری در طول موج ۵۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد. درصد مهار بیوفیلیم با مقایسه جذب نوری نمونه‌های دارای سوپرناتانت لاکتوباسیل با نمونه کنترل محاسبه گردید (۱۲).

شناسایی مولکولی ایزوله‌های لاکتوباسیل

برای شناسایی مولکولی ایزوله‌های لاکتوباسیل با فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی برجسته، استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری (سیناژن، ایران) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (پی‌سی‌آر)، جهت تکثیر ناحیه rRNA 16S با استفاده از آغازگرهای (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 27F و (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 1492R انجام شد (۱۳). محصول پی‌سی‌آر در دستگاه الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ مشاهده و باندها با رنگ Safe stain (سیناکلون، ایران) رنگ‌آمیزی شدند. سپس محصولات پی‌سی‌آر جهت تعیین توالی به شرکت MacroGen (کره جنوبی) ارسال شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و پایگاه داده BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) مقایسه

دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون، کلنی‌های رشد یافته برداشت شده و بر روی پلیت جدید MRS آگار مجدداً خالص‌سازی شدند. ایزوله‌هایی که از نظر تست کاتالاز، منفی، گرم مثبت و دارای شکل میله‌ای بودند، به عنوان لاکتوباسیل شناسایی و برای نگهداری در محیط شیر بدون چربی حاوی ۲۰٪ گلیسرول (مرک، آلمان) در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (۱۰).

بررسی خاصیت ضد میکروبی ایزوله‌های جدا شده

برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی، از دوسویه استاندارد باکتری بیماری‌زای غذازاد / استافیلوکوکوس / اورئوس ATCC 25923 و سالمونلا تیفی موریوم ATCC 14028 استفاده شد. این سویه‌ها از انسیتیتو پاستور ایران تهیه شده و مطابق با دستورالعمل‌های استاندارد در محیط نوترینت برات و نوترینت آگار کشت داده شدند. برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل جدا شده از کفیر، از روش چاهک روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان)، استفاده شد. ابتدا جدایه‌های لاکتوباسیل در محیط MRS مایع کشت داده شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس کشت مایع باکتری‌ها سانتریفیوژ شده (۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) و سوپرناتانت حاصل از آن جدا گردید. سوپرناتانت با فیلتر ۰/۲۲ میکرون استریل شد (۱۰). سوسپانسیونی تازه از سویه‌های پاتوژن / استافیلوکوکوس / اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند آماده و به صورت پخش سطحی روی محیط مولر هینتون آگار کشت شد. سپس چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر روی پلیت‌ها ایجاد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت کشت لاکتوباسیل‌ها به داخل آن‌ها اضافه شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه‌گیری شد (۱۱).

آزمون t زوجی استفاده گردید. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

پس از تخمیر شیر با دانه‌های کفیر و انجام مراحل رقیق‌سازی و کشت سطحی روی محیط MRS آگار، رشد کلنی‌های متعددی مشاهده شد. در مجموع، ۲۳ جدایه باکتریایی از محیط کشت جدا شد. از این میان، ۱۰ ایزوله گرم مثبت، کاتالاز منفی و شکل میله‌ای داشتند که به‌عنوان اعضای احتمالی جنس *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند. تمام جدایه‌ها روی پلیت MRS آگار رنگ‌های سفید شیری و کرمی نشان دادند (جدول ۱). این جدایه‌ها پس از خالص‌سازی مجدد روی محیط MRS آگار، برای انجام آزمون‌های بعدی در محیط شیر بدون چربی حاوی ۲۰٪ گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

گردیدند و شناسایی نهایی بر اساس بیشترین تطابق با سویه‌های ثبت‌شده در GenBank انجام شد. سپس توالی‌ها با استفاده از ابزار جست‌وجوی BLAST برای یافتن نزدیک‌ترین خویشاوندان فیلوژنتیکی ژن توالی‌یابی‌شده، هم‌تراز شدند. برای مقایسه توالی اجماعی و رسم دندروگرام بر اساس شباهت توالی نوکلئوتیدی، از نرم‌افزار MEGA نسخه ۵ استفاده شد. درخت تکاملی با استفاده از روش Neighbor-Joining و با ۱۰۰۰ بار تکرار آزمون بوت‌استرپ^۱ رسم گردید (۱۴).

تخمیر کربوهیدرات‌ها

تولید اسید از کربوهیدرات‌ها (فروکتوز، لاکتوز، گلوکز، ساکارز، مانیتول، ترهالوز، مانوز و مالتوز) (مرک، آلمان) طبق روش گزارش‌شده توسط Ricciardi و همکاران (۲۰۰۵) ارزیابی شد (۱۵). محلول ۱۰۰ گرم بر لیتر از هر قند تهیه و با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر استریل گردید. یک میلی‌لیتر از محلول هر قند به ۹ میلی‌لیتر از محیط پایه MRS فاقد گلوکز و عصاره گوشت و حاوی ۰/۱۶ گرم بر لیتر بروموکروزول بنفش، با pH برابر ۷ افزوده شد و سپس ۱۸۰ میکرولیتر از آن به چاهک‌های میکروپلیت منتقل گردید. کشت شبانه باکتری‌های *لاکتوباسیل* به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ ($1000 \times g$) شد و سوسپانسیون در محلول سرم فیزیولوژی استریل تهیه گردید. میزان ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به هر چاهک اضافه شد. درب میکروپلیت بسته شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. تغییر رنگ از بنفش به قرمز به‌عنوان واکنش مثبت تلقی شد (۱۱).

آنالیز آماری

تمام آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ و با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه میانگین قطر هاله ممانعت از رشد و میزان مهار بیوفیلم بین سویه‌های *لاکتوباسیلوس* انجام شد. همچنین برای مقایسه اثر هر سویه *لاکتوباسیل* بر دو باکتری پاتوژن، از

¹ Bootstrap

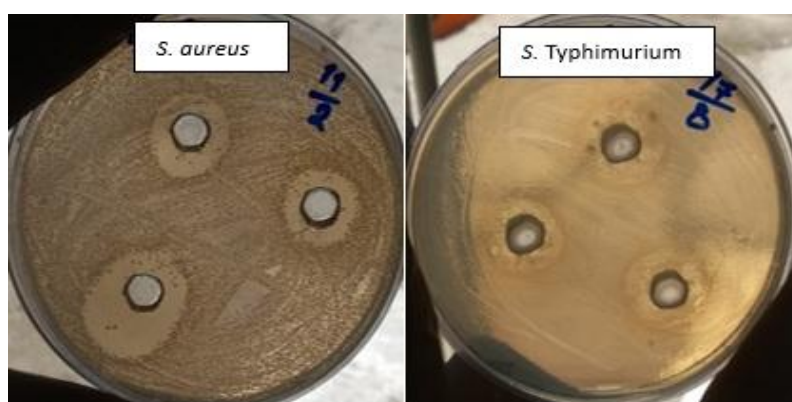
جدول ۱- ویژگی‌های جدایه‌های به دست آمده از کفیر

رنگ آمیزی گرم	شکل باکتری	مورفولوژی کلنی	کد جدایه
+	باسیل	سفید کرمی، گرد، برآمده، شفاف، کلنی‌های صاف، سطح مرطوب	Lb1
+	باسیل	سفید کرمی، دایره‌ای، برآمده، شفاف، کلنی‌های صاف، سطح مرطوب	Lb2
+	باسیل	گرد شیری برآمده	Lb3
+	باسیل	سطح مرطوب دایره‌ای، برجسته، شفاف، رنگ سفید شیری.	Lb4
+	باسیل	سطح مرطوب دایره‌ای، برجسته، شفاف، رنگ سفید شیری.	Lb5
+	باسیل	سطح مرطوب دایره‌ای، برجسته، شفاف، شیری رنگ	Lb6
+	باسیل	کلنی‌های سفید، شفاف، سطح مرطوب	Lb7
+	باسیل	سفید کرمی، دایره‌ای، برآمده، شفاف، کلنی‌های صاف، سطح مرطوب	Lb8
+	باسیل	دایره‌ای، برآمده، شیری	Lb9
+	باسیل	کلنی‌های دایره‌ای، برآمده، شفاف، صاف، با سطح مرطوب	Lb10

اثرات ضدباکتریایی

در این مطالعه، اثر ضدباکتریایی ۱۰ سویه لاکتوباسیلوس بر علیه دو گونه باکتری بیماری‌زا، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی‌موریوم ارزیابی شد (شکل ۱). قطر هاله مهار رشد باکتری‌ها به عنوان شاخصی از فعالیت ضدباکتریایی هر سویه اندازه‌گیری گردید. نتایج حاصل از آزمون چاهک نشان داد که اکثر جدایه‌ها قادر به تولید ترکیبات بازدارنده رشد پاتوژن‌ها بودند. میانگین قطر هاله عدم رشد برای *استافیلوکوکوس اورئوس* در محدوده ۱۲-۱۷ میلی‌متر و برای *سالمونلا* تیفی‌موریوم در محدوده ۹-۱۵ میلی‌متر مشاهده شد. نتایج نشان داد که تمام سویه‌ها توانایی مهار رشد باکتری‌ها را دارند، ولی شدت

این اثر متفاوت است. بیشترین قطر هاله مهار در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به سویه Lb7 با مقدار 17.1 ± 0.9 میلی‌متر بود، درحالی‌که کمترین آن متعلق به سویه Lb5 با 11.6 ± 0.3 میلی‌متر بود. در مقابل، برای *سالمونلا* تیفی‌موریوم، سویه Lb7 نیز بیشترین فعالیت را با 15.9 ± 0.5 میلی‌متر نشان داد و سویه Lb5 کمترین فعالیت را داشت (جدول ۲). تحلیل آماری اختلاف معنی‌داری در قطر هاله مهار برخی سویه‌ها را تأیید کرد؛ برای مثال، سویه‌های Lb4 و Lb7 نسبت به سایر ایزوله‌ها قدرت مهار بیشتری برای هر دو باکتری بیماری‌زا نشان دادند ($P < 0.05$).



شکل ۱- بررسی خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیل‌های جدا شده بر روی باکتری‌های بیماری‌زای غذازاد به روش چاهک

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد (میلی متر) / استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم توسط جدایه های لاکتوباسیلوس

سطح معنی داری	قطر هاله عدم رشد (mm)		کد جدایه
	سالمونلا تیفی موریوم	استافیلوکوکوس اورئوس	
NS	$10/8 \pm 0/6^a$	$12/3 \pm 0/5^a$	Lb1
$P < 0/05$	$11/2 \pm 0/3^a$	$14/7 \pm 0/4^b$	Lb2
NS	$12/9 \pm 0/7^b$	$13/1 \pm 0/6^a$	Lb3
$P < 0/01$	$14/5 \pm 0/6^c$	$16/4 \pm 0/5^c$	Lb4
NS	$9/2 \pm 0/5^a$	$11/6 \pm 0/3^a$	Lb5
$P < 0/05$	$13/7 \pm 0/4^c$	$15/2 \pm 0/7^b$	Lb6
$P < 0/01$	$15/9 \pm 0/5^d$	$17/1 \pm 0/6^c$	Lb7
NS	$11/0 \pm 0/4^a$	$13/3 \pm 0/4^a$	Lb8
NS	$12/1 \pm 0/5^b$	$12/7 \pm 0/3^a$	Lb9
$P < 0/05$	$13/2 \pm 0/6^b$	$14/9 \pm 0/5^b$	Lb10

اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده اند ($n=3$). حروف مختلف (a, b, c و d) در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار بین سویه ها هستند ($P < 0/05$). (آزمون ANOVA یک طرفه و آزمون توکی). ستون نتایج آماری تفاوت معنی دار بین اثر ضد میکروبی هر جدایه لاکتوباسیلوس بر استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم را نشان می دهد (آزمون t زوجی). علامت NS نشان دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی دار است.

اثر ضد بیوفیلمی جدایه های جدا شده از کفیر

در این مطالعه، اثر ضد بیوفیلمی ۱۰ سویه لاکتوباسیلوس بر روی دو باکتری بیماری زای استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم بررسی شد (جدول ۳). درصد مهار بیوفیلם برای هر سویه بر اساس میانگین و انحراف معیار گزارش شد و تحلیل آماری با آزمون ANOVA و تست توکی انجام گردید. نتایج نشان داد که جدایه ها از نظر توانایی مهار بیوفیلם بر روی هر دو باکتری با هم اختلاف دارند. برای نمونه، سویه های Lb4، Lb7 و Lb6

بیشترین درصد مهار بیوفیلם را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۵۴-۶۲٪) و سالمونلا تیفی موریوم (۶۳-۵۶٪) نشان دادند. در مقابل، سویه های Lb5 و Lb8 کمترین درصد مهار را در برابر استافیلوکوکوس اورئوس (۳۹-۴۱٪) و سالمونلا تیفی موریوم (۳۸-۴۳٪) داشتند. مقایسه خاصیت ضد بیوفیلمی هر جدایه بر روی دو باکتری با آزمون t زوجی نشان داد که در بیشتر سویه ها تفاوت معنی داری وجود ندارد ($P < 0/05$). باین حال، در سویه های Lb3 و Lb9 تفاوت معنی داری در میزان مهار بیوفیلם بین دو باکتری مشاهده شد.

جدول ۳- درصد مهار بیوفیلیم در استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم توسط جدایه‌های لاکتوباسیل

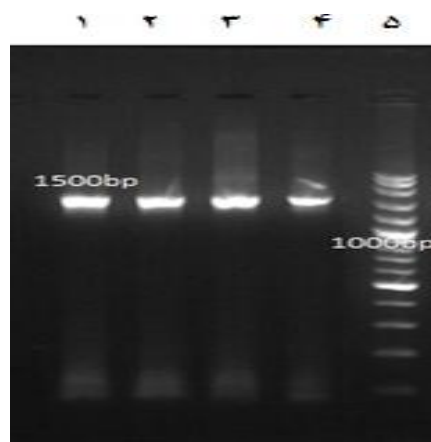
سطح معنی داری	مهار بیوفیلیم (%)		کد جدایه
	سالمونلا تیفی موریوم	استافیلوکوکوس اورئوس	
(NS)	$42/0 \pm 1/8^a$	$45/2 \pm 2/1^a$	Lb1
(NS)	$50/4 \pm 1/9^b$	$53/5 \pm 1/7^b$	Lb2
$P < 0/05$	$55/1 \pm 2/2^c$	$47/8 \pm 2/3^a$	Lb3
(NS)	$59/9 \pm 1/7^c$	$60/4 \pm 1/5^c$	Lb4
(NS)	$38/2 \pm 2/1^a$	$39/7 \pm 1/9^d$	Lb5
(NS)	$56/7 \pm 1/5^c$	$54/3 \pm 2/0^b$	Lb6
(NS)	$63/3 \pm 2/0^c$	$62/1 \pm 1/8^c$	Lb7
(NS)	$43/5 \pm 1/7^a$	$41/0 \pm 2/2^a$	Lb8
$P < 0/05$	$52/0 \pm 1/8^b$	$48/5 \pm 1/9^a$	Lb9
(NS)	54.1 ± 2.3^c $54/1 \pm 2/3^c$	$55/7 \pm 2/1^b$	Lb10

اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند ($n=3$). حروف مختلف (a, b, c و d) در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین جدایه‌ها هستند ($P < 0/05$)، (آزمون ANOVA یک‌طرفه و آزمون توکی). ستون نتایج آماری تفاوت معنی‌دار بین اثر ضد بیوفیلمی هر جدایه لاکتوباسیلوس بر استافیلوکوکوس اورئوس و سالمونلا تیفی موریوم را نشان می‌دهد (آزمون t زوجی). علامت NS نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی‌دار است.

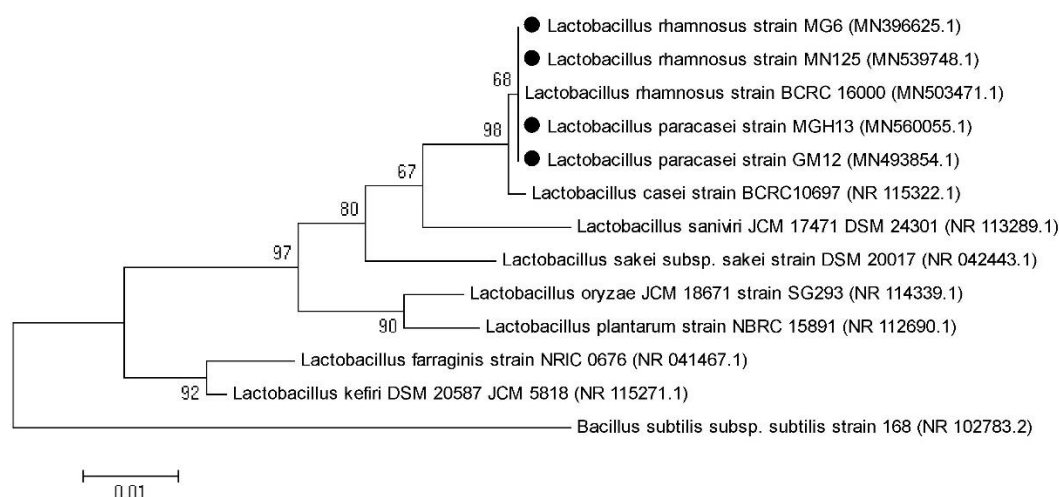
لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پاراکازنی تعلق دارند. توالی‌های به‌دست‌آمده در پایگاه GenBank ثبت شدند. رابطه فیلوژنتیکی ایزوله‌های لاکتوباسیل منتخب در میان اعضای جنس لاکتوباسیلوس در شکل (۳)، نمایش داده شده است.

شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب جدا شده از کفیر

از بین سویه‌های مورد مطالعه، ۴ جدایه برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. نتیجه پی‌سی‌ار ژن 16S rRNA در شکل (۲)، نشان داده شده است. محصول پی‌سی‌ار پس از خالص‌سازی توالی‌یابی شد. شناسایی مولکولی بر اساس توالی ژن 16S rRNA نشان داد که جدایه‌ها به گونه‌های



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصول پی‌سی‌ار ژن 16S rRNA برای ۴ جدایه منتخب



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی و شماره دسترسی بر پایه توالی ژن 16S rRNA مربوط به جدایه‌های منتخب لاکتوباسیل

تخمیر کربوهیدرات

الگوی تخمیر کربوهیدرات ایزوله‌های منتخب در جدول (۴)، نشان داده شده است. در میان آن‌ها، جدایه Lb4 قادر به تخمیر تمام قندهای آزمایش شده بود.

جدول ۴- الگوی تخمیر قند در جدایه‌های منتخب

کربوهیدرات								جدایه
مانوز	فروکتوز	سوکروز	ماتیتول	لاکتوز	گلوکز	مالتوز	ترهالوز	
+	+	+	+	+	+	+	+	Lb4
+	+	-	+	+	+	+	+	Lb6
+	+	+	-	+	+	-	+	Lb7
+	+	+	+	+	+	+	-	Lb10

ایزوله‌های منتخب به گونه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی تعلق دارند، که با مطالعات پیشین درباره حضور این گونه‌ها در نوشیدنی‌های تخمیری سنتی مانند کفیر هم‌خوانی دارد (۱۶). شناسایی ۱۰ گونه لاکتوباسیلوس از کفیر با مطالعات قبلی که شیوع این باکتری‌ها را در کفیر برجسته می‌کنند، همسو است (۱۷، ۱۸). مشاهده کلنی‌های سفید و کرمی روی پلیت‌های MRS آگار با مورفولوژی معمول گونه‌های لاکتوباسیلوس مطابقت دارد (۱۹). پروفایل‌های متنوع

بحث

در این مطالعه، با هدف شناسایی و بررسی فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضدبیوفیلمی لاکتوباسیلوس‌های استخراج‌شده از کفیر، ۱۰ جدایه مختلف به دست آمد. این جدایه‌ها بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیکی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش کاتالاز، به عنوان اعضای احتمالی جنس لاکتوباسیلوس شناسایی شدند. در ادامه برای تأیید دقیق‌تر هویت ژنتیکی، از توالی‌یابی ناحیه 16S rRNA استفاده شد. نتایج Blast نشان داد که

تخمیر کربوهیدرات مشاهده شده در بین جدایه ها، نشان دهنده تنوع متابولیکی در این جنس است که برای سازگاری آن ها با محیط های مختلف و نقش آن ها در فرآیندهای تخمیر بسیار مهم است. آزمایش های بیوشیمیایی وجود ویژگی های مشخص گونه های لاکتوباسیلوس، از جمله توانایی آن ها در تخمیر گلوکز و سایر کربوهیدرات ها را تأیید کرد. این ویژگی، استفاده از آن ها را در صنایع غذایی برای تولید محصولات تخمیری پشتیبانی می کند (۲۰). توالی یابی 16S rRNA به عنوان ابزاری دقیق برای شناسایی سویه های لاکتوباسیلوس در این مطالعه نقش کلیدی داشت. این شناسایی ژنتیکی برای درک نقش ها و مزایای خاص گونه های مختلف لاکتوباسیلوس در تخمیر مواد غذایی و کاربردهای بالقوه پروبیوتیک بسیار مهم است. یافته های حاصل از این تحقیق بر اهمیت تکنیک های مولکولی در شناسایی دقیق و توصیف جوامع میکروبی در غذاهای تخمیری تأکید دارند. فعالیت ضدباکتریایی سویه های جدا شده علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی موریوم با روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج، اثربخشی ترکیبات موجود در سوپرناتانت بدون سلول تولید شده توسط ایزوله های لاکتوباسیلوس را در برابر پاتوژن های رایج منتقله از طریق غذا مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی موریوم را اثبات نمود. این یافته با پژوهش های پیشین هم راستا است (۱۹). همچنین، یرلیکاریا^۱ و همکاران گزارش کردند که باکتری های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات لبنی تخمیری بورکینافاسو نیز فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی از خود نشان داده اند (۲۱). مطالعه ی یزدان و همکاران (۲۰۲۰)، نشان داد که باکتری های اسیدلاکتیک می توانند باکتریوسین ها، اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن تولید کنند که همگی به ویژگی های ضدباکتریایی آن ها کمک می کنند (۲۲). نتایج نشان داد که اکثر جدایه ها دارای خاصیت ضدباکتریایی قابل ملاحظه ای بودند، باین حال اثر آن ها بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در اغلب موارد قوی تر بود. این موضوع احتمالاً به این دلیل است که باکتری های گرم مثبت فاقد غشای خارجی هستند و در نتیجه نسبت به ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدلاکتیک و باکتریوسین ها

نفوذپذیرترند. آزمون آماری نشان داد که در چندین مورد مانند سویه های Lb4, Lb6 و Lb7 تفاوت معنی داری در قطر هاله عدم رشد میان دو باکتری مشاهده شد ($P < 0.01$)، که نشان دهنده حساسیت بالاتر باکتری گرم مثبت نسبت به سویه های لاکتوباسیلوس می باشد. یافته های این مطالعه نشان داد که سویه های مختلف لاکتوباسیلوس دارای توانایی متفاوتی در مهار رشد باکتری های بیماری زا هستند که می تواند به دلیل تفاوت در ساختار و عملکرد متابولیت های ضدباکتریایی تولید شده باشد. سویه هایی مانند Lb7 و Lb4 با ایجاد قطر هاله مهار بیشتر، نشان دهنده پتانسیل بالاتری در فعالیت ضدباکتریایی هستند که می تواند آن ها را به عنوان گزینه های مناسبی برای کاربردهای پروبیوتیکی و کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری زا معرفی نماید. این اختلاف در اثرگذاری سویه ها ممکن است به تفاوت در تولید اسید لاکتیک، پراکسید هیدروژن، یا سایر ترکیبات ضدباکتریایی مانند باکتریوسین ها بازگردد. همچنین، تفاوت در حساسیت باکتری های هدف نسبت به متابولیت های لاکتوباسیلوس ها نیز می تواند نقش داشته باشد. نتایج به دست آمده با برخی مطالعات پیشین که بیانگر تنوع اثر پروبیوتیک ها و اهمیت انتخاب سویه مناسب است همخوانی دارد (۱۹). بنابراین، انتخاب سویه های دارای فعالیت بالاتر می تواند در توسعه محصولات پروبیوتیک مؤثرتر باشد. به طور کلی، این مطالعه اهمیت بررسی فعالیت ضدباکتریایی هر سویه به صورت جداگانه را تأکید می کند تا بتوان از این باکتری ها به بهترین شکل در کنترل میکروارگانیسم های بیماری زا بهره برد. نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد که لاکتوباسیل های جدا شده از کفیر دارای پتانسیل بالایی در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم دو پاتوژن مهم غذازا، یعنی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی موریوم هستند. این یافته ها با مطالعات پیشین هم راستا هستند که نشان داده اند برخی از سویه های لاکتوباسیلوس دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی قابل توجهی علیه میکروارگانیسم های پاتوژن هستند (۲۳، ۲۴). در مطالعه انجام شده مشابهی لاکتوباسیلوس پلانتروم جدا شده از غذاهای تخمیری فعالیت ضد بیوفیلمی قابل توجهی بر علیه پاتوژن های غذایی نشان دادند (۱۹). مطالعه انجام شده توسط قانع و همکاران توانایی مؤثر سویه های لاکتوباسیلوس را در حذف بیوفیلم پاتوژن هایی مانند

¹ Yerlikaya

برچسب پاک هم‌راستا بوده و جایگزینی برای نگهدارنده‌های شیمیایی ارائه می‌دهد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که برخی گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از کفیر دارای اثرات قابل توجهی در مهار رشد و تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای غذایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی‌موریوم هستند. این جدایه‌ها با ایجاد هاله‌های عدم رشد نسبتاً گسترده و جلوگیری مؤثر از تشکیل بیوفیلم، به‌عنوان عوامل زیستی ایمن و کارآمد برای پیشگیری از آلودگی‌های غذایی مطرح می‌شوند. بر همین اساس، بهره‌گیری از این باکتری‌های پروبیوتیک در صنعت غذا، به‌ویژه در ساخت نگهدارنده‌های طبیعی، می‌تواند راهکاری نوین برای کاهش وابستگی به مواد نگهدارنده شیمیایی ارائه دهد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

شریشیا کلی نشان داد (۱۰). پتانسیل ضدبیوفیلمی لاکتوباسیلوس‌ها توسط مطالعات انجام شده توسط پنگ^۱ و همکاران نیز تأیید می‌شود (۲۵). مطالعه‌ی لاگرافولی^۲ و همکاران بر تنوع ترکیبات ضد میکروبی موجود در سوپرناتانت لاکتوباسیلوس تأکید داشت، آنان گزارش کردند که ترکیباتی از جمله پراکسید هیدروژن، متابولیت‌های اکسیژن، اگزوپلی‌ساکاریدها و اسیدهای چرب اشباع‌شده، که به‌عنوان بیوسورفکتانت عمل می‌کنند، به خواص ضدبیوفیلمی لاکتوباسیل‌ها کمک می‌کند (۲۶). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیلوس به‌صورت متفاوتی قادر به مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سالمونلا* تیفی‌موریوم هستند. در این میان سویه‌های Lb4 و Lb7 توانایی بیشتری داشتند. توانایی این سویه‌ها در ایجاد درصد مهار بالاتر، احتمالاً ناشی از تولید متابولیت‌های ضدبیوفیلمی قوی‌تر است. عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین مهار بیوفیلم در اکثر سویه‌ها برای دو باکتری ممکن است نشان‌دهنده مکانیزم‌های مشابه اثرگذاری لاکتوباسیلوس‌ها بر هر دو نوع بیوفیلم باشد. باین‌حال، تفاوت قابل توجه در سویه‌های Lb3 و Lb9 می‌تواند به تفاوت حساسیت بیوفیلم این باکتری‌ها نسبت داده شود. این یافته‌ها اهمیت انتخاب سویه‌های خاص برای کاربردهای پروبیوتیکی و ضدبیوفیلمی در صنایع دارویی و غذایی را برجسته می‌کند. به‌علاوه، نتایج تأکید می‌کند که بررسی جداگانه اثر سویه‌ها بر هر باکتری برای طراحی استراتژی‌های مقابله با بیوفیلم ضروری است. هم‌خوانی نتایج ما با مطالعات مختلف، بر قابلیت اطمینان سویه‌های لاکتوباسیلوس، در مقابله با تشکیل بیوفیلم و ارتقاء پروتکل‌های ایمنی غذایی تأکید دارد. یافته‌های این مطالعه کاربرد نویدبخش ایزوله‌های جدا شده از کفیر را به‌عنوان یک عامل ضد میکروبی طبیعی در نگهداری ایمنی غذا نشان می‌دهند. این پروبیوتیک‌ها با مهار مؤثر تشکیل بیوفیلم می‌توانند خطرات ناشی از پاتوژن‌های مرتبط با بیوفیلم را در محیط‌های فرآوری و نگهداری مواد غذایی کاهش دهند. استفاده از چنین مداخلات طبیعی، با ترجیحات مصرف‌کنندگان برای محصولات با

¹ Peng

² Lagrafeuille

References

1. Bourrie BC, Willing BP, Cotter PD. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:196946.
2. Leite AMdO, Miguel MAL, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT, Paschoalin VMF. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44:341-9.
3. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E, editors. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications: Proceedings of the seventh Symposium on lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, 1–5 September 2002, Egmond aan Zee, the Netherlands; 2002: Springer.
4. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016;14(9):563-75.
5. Khaneghah AM, Abhari K, Eş I, Soares MB, Oliveira RB, Hosseini H, Rezaei M, Balthazar CF, Silva R, Cruz AG, Ranadheera CS. Interactions between probiotics and pathogenic microorganisms in hosts and foods: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;95:205-18.
6. Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international*. 2014;2014(1):827965.
7. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler Jr VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2015;28(3):603-61.
8. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*. 2012;45(2):819-30.
9. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 2012;45(2):502-31.
10. Ghane M, Babaekhou L, Ketabi SS. Antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC). *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 2020;12(4):221.
11. Ghane M, Babaekhou L, Najafabadi BM, Mirmostafa MS. Lactic acid bacteria from kefir grains: Potential probiotics with antagonistic activity against multidrug resistant Gram-negative bacteria. *Malays. Journal of Microbiology*. 2021;17(4):414-23.
12. Lee JE, Lee NK, Paik HD. Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. *Food science and biotechnology*. 2021;30(1):97-106.
13. Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VM, Mayo B, Delgado S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of dairy science*. 2015;98(6):3622-32.
14. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2004; (30):11030-5.
15. Ricciardi A, Parente E, Piraino P, Paraggio M, Romano P. Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *International Journal of Food Microbiology*. 2005;98(1):63-72.
16. Bengoa AA, Dardis C, Garrote GL, Abraham AG. Health-promoting properties of *Lactobacillus paracasei*: A focus on kefir isolates and exopolysaccharide-producing strains. *Foods*. 2021;10(10):2239.
17. Talib N, Mohamad NE, Yeap SK, Hussin Y, Aziz MN, Masarudin MJ, Sharifuddin SA, Hui YW, Ho CL, Alitheen NB. Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from kefir samples in Malaysia. *Molecules*. 2019;24(14):2606.

18. Georgalaki M, Zoumpopoulou G, Anastasiou R, Kazou M, Tsakalidou E. *Lactobacillus kefiranofaciens*: From isolation and taxonomy to probiotic properties and applications. *Microorganisms*. 2021;9(10):2158.
19. Hussein AO, Khalil K, Zaini NAM, Al Atya AK, Aqma WS. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented foods and their inhibitory effect against foodborne pathogens. *PeerJ*. 2025;13:e18541.
20. Fan B, Blom J, Klenk H-P, Borriess R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8:22.
21. Yerlikaya O, Saygili D, Akpınar A. Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*. 2020;41(2):418-25.
22. Yazgan H, Kuley E, Güven Gökmen T, Regenstien JM, Özogul F. The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2021;45(1):e15085.
23. Reis J, Paula A, Casarotti S, Penna A. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*. 2012;4:124-40.
24. Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. *Letters in Applied Microbiology*. 2010;50(4):419-24.
25. Peng S, Song J, Zeng W, Wang H, Zhang Y, Xin J, Suo H. A broad-spectrum novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. 2021:21-2.
26. Lagrèfeuille R, Miquel S, Balestrino D, Vareille-Delarbre M, Chain F, Langella P, Forestier C. Opposing effect of *Lactobacillus* on in vitro *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an in vivo intestinal colonisation model. *Beneficial Microbes*. 2018;9(1):87-100.