غربال‌گری و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک شیر الاغ با استفاده از تکنیک طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR)

محمد جواد اکرمی[a]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[b*]، احمد اسماعیلی[b]، مهدی باقری ششده[a]

[a] *دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران*
[b] *دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۴/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۵/۳۰

چکیده

مقدمه: باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB)، گروه هتروژنی از باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که در جریان تخمیر کربوهیدرات‌ها اسید لاکتیک تولید می‌کنند. بسیاری از باکتری‌های اسیدلاکتیک با تولید بیوپلیمرها مفید صنعتی تأثیری بسزایی بر بهبود طعم، بافت و ماندگاری بسیاری از محصولات لبنی دارند. روش‌های متعددی برای شناسایی باکتری‌ها وجود دارد که برخی از آنها از دقت کمی برخوردارند و برخی دیگر بسیار پرهزینه هستند. معرفی روشی دقیق، سریع و کم هزینه در این راستا مهم است.

مواد و روش‌ها: به منظور شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک پروبیوتیک شیر، مطالعه‌ای روی شیر الاغ صورت گرفت. برای این منظور، از روش‌های کلاسیک میکروب شناسی و بیوشیمیایی و روش طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FTIR) استفاده شد. از تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) و خوشه‌بندی برای بررسی صحت داده‌های طیف‌سنجی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج روش‌های کلاسیک میکروب شناسی نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده به دو جنس انتروکوکوس و استرپتوکوکوس تعلق دارند. همچنین نتایج روش FTIR نشان داد که ایزوله‌های جداسازی شده‌ی جنس استرپتوکوکوس و جنس انتروکوکوس به ترتیب به گونه‌های دیورسی و فکالیس تعلق دارند. تجزیه تحلیل طیف‌های IR به کمک تجزیه به مولفه‌های اصلی(PCA) درستی و توانایی تکنیک FTIR را در شناسایی دو جنس یاد شده اثبات نمود.

نتیجه‌گیری: قبل از اقدام به شناسای باکتری‌ها به روش‌های پیچیده و پر هزینه‌ای همانند توالی‌یابی DNA، بهتر است تا از روش FTIR استفاده شود. این روش سریع و کم هزینه است و باکتری‌ها را در سطح جنس و حتی گونه شناسایی می‌کند. در این مطالعه، دو جنس از باکتری‌ها، یکی از آنها به نام *Streptococcus devriesei* برای اولین بار در ایران به کمک روش‌های مبتنی بر کشت و *FTIR* شناسایی و تائید شدند.

واژه‌های کلیدی: *اسید لاکتیک، پروبیوتیک، شیر الاغ، طیف سنجی، میکروب*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: nazarian.f@lu.ac.ir

مقدمه

شناسایی، جداسازی و غربال میکروارگانیسم‌ها از منابع طبیعی، وسیله‌ای موثر برای دست‌یابی به گونه‌هایی از باکتری‌هاست که از لحاظ ژنتیکی و صنعتی حائز اهمیت هستند. طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها در شرایط مختلف در اطراف ما در حال زندگی هستند که بسیاری از آنها نقش موثری در بهبود شرایط زندگی سایر موجودات از جمله انسان بازی می‌کنند (Reid, 1999). برای مثال، باکتری‌های اسیدلاکتیک[1]، پربیوتیک‌های زنده‌ای هستند که با اصلاح تعادل میکروبی داخل دستگاه گوارش، به خصوص محیط روده، باعث بهبود سیستم ایمنی بدن، جلوگیری از عفونت‌های باکتریایی و جلوگیری و درمان اسهال در انسان می‌شوند(Burgula *et al.*, 2006). باکتری‌های اسیدلاکتیک در زیستگاههای طبیعی نظیر پیکره‌ی گیاهان، دستگاه گوارش جانوران از جمله معده‌ی زنبور عسل (Fujisawa & Mitsuoka, 1996; Schmitt *et al.*, 2002; Tannock, 2004) و همچنین به صورت طبیعی در سطوح مخاطی نظیر روده کوچک، روده بزرگ، و واژن انسان زندگی می‌کنند (Morelli, 2001). استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک در مواد غذایی روز به روز در حال افزایش است، به طوری که تقاضا برای مصرف مواد غذایی بخصوص مواد لبنی حاوی باکتری‌های مفید به طرز چشمگیری در دنیا افزایش پیدا کرده است. از این‌رو، جستجوی گونه‌های جدیدی از باکتری‌های مفید اسیدلاکتیک از منابع مختلف برای بهره‌برداری از آنها در تغذیه انسان بسیار حائز اهمیت است. شیر و مواد لبنی از جمله منابع سرشار از این قبیل باکتری‌ها هستند. در سال‌های اخیر، متخصصان تغذیه به شیر الاغ در مقایسه با شیر سایر پستانداران، به دلیل خواص تغذیه‌ای منحصر به فرد، برخورداری از فعالیت‌های ایمنولوژیکی و جلوگیری از آترواسکلروزیس[2] عدم تولید پروتئین‌های آلرژی‌زا توجه ویژه‌ای نموده‌اند(Riddle *et al.*, 1956). تا قبل از این، در مقایسه با شیر نشخوار کنندگان، مطالعات کمی روی شیر الاغ صورت گرفته است.

در حال حاضر برای شناسایی و طبقه‌بندی باکتری‌ها، از روش‌های مرسوم مبتنی بر آزمون‌های بیوشیمیایی یا سرولوژیکی و روش‌های مولکولی مبتنی بر انگشت نگاری DNA و RNA استفاده می‌شود. شناسایی باکتری‌ها به کمک روش‌ها مورفولوژیکی و بیوشیمیایی به دلیل سادگی و هزینه‌ی کم، کاربرد فراوانی در علوم صنایع غذایی و پزشکی دارند. سرعت پایین و دقت کم، از جمله معایب این روش‌هاست. از طرف دیگر، اگرچه شناسایی باکتری‌ها به کمک روش‌های مبتنی بر انگشت نگاری DNA از دقت بالایی برخوردارند، ولی به هزینه و وقت زیادی نیاز دارند. از این‌رو، به روش‌های دقیق، سریع و با توان عملیاتی بالایی نیاز است تا بتوان تعداد زیادی از باکتری‌ها را در کوتاهترین زمان ممکن شناسایی و غربال نمود. طیف سنجی مولکولی یکی از این قبیل روش‌ها است که به عنوان یک روش شناساسایی در سال ۱۹۵۰ معرفی شد(Levine *et al.*, 1953; Riddle *et al.*, 1956). استفاده از طیف سنجی ارتعاشی در آن زمان به دلیل محدودیت عملی و نبود سیستم آماری یکپارچه آنالیز داده‌ها غیر عملی بود. با ظهور تکنیک طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز(FTIR)[3]، Naumann و همکاران (۱۹۹۵، ۱۹۹۱) روش FTIR را برای تجزیه تحلیل آزمایشگاهی سلول‌های باکتریایی، شناسایی، تمایز و رده بندی باکتری‌ها، بکار بردند. پس از آن از طیف سنجی FTIR با موفقیت برای ردیابی، تمایز، شناسایی و رده بندی باکتری‌های متعلق به گونه‌های متفاوتی از پاتوژن‌ها به ویژه، پاتوژن‌های مواد غذایی نظیر لیستریا، ای‌کولا، سالمونلا، باسیلوس، یرسینیا (Kuhm, *et al.*, 2009)، استافیلوکوکوس (Filip *et al.*, 2004) استفاده شد. به‌علاوه، از طیف سنجیFTIR نه تنها برای شناسایی باکتری‌ها، بلکه برای فراهم کردن اطلاعاتی پیرامون متابولیسم باکتری‌ها (Becker *et al.*, 2006)، فاز رشدی آنها (AL-Qadiri *et al.*, 2008) و مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌ها (Amiali *et al.*, 2008b) نیز استفاده می‌شود. از طیف‌های FTIR باکتری‌ها می‌توان برای ارزیابی ترکیب کلی ساختار اجزاء تشکیل دهنده‌ی باکتری‌ها، از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای چرب، کربوهیدرات‌ها، نوکلئیک اسیدها و لیپوپلی‌ساکاریدها استفاده نمود (Davis & Mauer, 2010). Amiali و همکاران (۲۰۰۸)، توانایی FTIR را برای شناسایی و

[1] Lactic Acid Bacteria (LAB) [2] Atherosclerosis [3] Fourier Transform Infrared Spectroscopy

طبقه‌بندی باکتری‌های اسیدلاکتیک و تمایز گونه‌های بسیار نزدیک اثبات نمودند. همچنین محققان توانسته‌اند توانایی این روش را در شناسایی و تمایز گونه‌های مختلف لاکتوکوکوس در پنیر نشان دهند و گونه‌های لاکتوکوکوس را از گونه‌های بیماری‌زای *Listeria* و *Staphylococcus* در انواعی از پنیر به خوبی تشخیص دهند (Lamprell *et al.*, 2006; Rebuffo *et al.*, 2006). Oberreuter و همکاران (۲۰۰۲) تنوع درون گونه‌ای را در سه باکتری اکتینومیست (*Rhodococcus erythropolis*, *Corynebacterium mglutamicum*, *Brevibacterium linens*) را با استفاده از هر دو روش FTIR و ۱۶SrDNA بررسی کردند. این محققان معتقدند که کارایی FTIR تنها در سطح گونه است و در سطح زیر گونه نمی‌تواند ابزار مناسبی برای بررسی ارتباط تاکسنومی گونه ها باشد زیرا هرچند با این روش تنوعات در سطح زیر گونه دیده می‌شود اما این تنوعات متفاوت از تنوعاتی است که با روش ۱۶SrDNA بین سویه‌ها مشاهده می‌شود. Lin و همکاران (۲۰۰۴ و ۲۰۰۷) برای تحلیل فیلوژنی جدایه‌هایی از باکتری *Alicyclobacillus* با استفاده از دو روش FTIR و ۱۶SrDNA پیشنهاد کردند که ترکیب هر دو روش می‌تواند ابزاری مناسب برای شناسایی و تمایز سریع و مطمئن باکتری‌ها فراهم آورد. Kirschner و همکاران (۲۰۰۱) از FTIR و روش‌ها مولکولی برای شناسایی و رده بندی باکتری جنس انتروکوکوس استفاده کردند آن‌ها در این پژوهش از ۱۸ سویه باکتری انتروکوکوس جداسازی شده از منابع مختلف بیمارستانی و مواد غذایی آلوده استفاده کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ترکیب دو روش FTIR و ۱۶SrDNA می‌تواند روش قدرتمندی برای شناسایی و رده بندی باکتری‌ها باشد. Zhao و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از FTIR و تحلیل نتایج با PCA چهار جدایه از *Streptomyces* را که از نظر توالی ۱۶SrDNA کاملا شباهت داشتند اما بر اساس ظاهر میسیلیوم، اسپور و رنگدانه با هم متفاوت بودند، از یکدیگر تفکیک کنند (Zhao *et al.*, 2006). به طور کلی، هدف از این پژوهش، مقایسه دو روش بیوشیمیایی و FTIR برای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک (در سطح گونه) موجود در شیر الاغ به عنوان روشی سریع، کم هزینه و مقدماتی بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سه مرحله‌ی: غربال اولیه باکتری‌ها با استفاده از روش‌های مرسوم مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، شناسایی باکتری‌ها در سطح گونه با دو روش بیوشیمیایی و FTIR و در نهایت، مقایسه نتایج حاصل از این دو روش انجام شد.

- **جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک**

در تابستان ۱۳۹۳، از شیر سه ماده الاغ سالم عشایر منطقه سلسه در شمال استان لرستان به صورت تصادفی نمونه‌گیری صورت گرفت. نمونه‌ها بالافاصله روی یخ خنک شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. به منظور فراهم آوردن شرایط کشت، از نمونه‌های شیر با استفاده از افزودن سرم فیزیولوژی (۰/۹ w/v NaCl درصد) رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه گردید. از هر یک از رقت‌های یاد شده، مقدار یک میلی‌لیتر در محیطMRS جامد، کشت گردید. محیط‌های کشت در دو دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از رشد باکتری‌ها، کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت از نظر اندازه و شکل مورد ارزیابی قرار گرفتند. از تمام کلونی‌هایی که نماینده‌ی همه اندازه‌ها و اشکال بودند، به صورت تصادفی تعدادی کلونی انتخاب و در محیط‌های MRS جامد تازه-کشت داده شدند. عمل باز کشت تا اطمینان از خلوص کلونی‌های حاصل هر دو روز یکبار انجام گرفت. در مجموع تعداد ۷۰ کلونی مجزا و خالص از مجموع همه نمونه‌ها، انتخاب و از آنها برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد. به منظور غربالگری اولیه باکتری‌ها، آزمون‌های گرم (Madigan *et al.*, 2004) و کاتالاز (Akabanda *et al.*, 2010) روی همه‌ی باکتری‌ها صورت گرفت. جهت انجام آزمون کاتالاز، کشت تازه‌ی هر یک از کلونی‌ها از محیطMRS جامد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ساعت تهیه شد. تولید حباب‌های اکسیژن پس از مجاورت باکتری‌ها با پراکسید هیدروژن، نشانه‌ی مثبت بودن آزمون کاتالاز تلقی گردید (Akabanda *et al.*, 2010). برای تشخیص شکل و آرایش باکتری‌ها از میکروسکوپ‌های نوری (×۱۰۰) و الکترونی پس از تیمار با گلوتارآلدئید (۲٪) استفاده شد. به طور خلاصه، ابتدا کشت

یک شبه از باکترها تهیه شد. پس از سانتریفیوژ باکتری در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه مایع روشناور دور ریخته شد و رسوب باکتری‌ها نگهداری شد. سپس مقدار ۵ میلی‌لیتر آب استریل به لوله‌های کشت اضافه شد و رسوب باکتری‌ها حل گردید. این مرحله از شستشو دو بار دیگر تکرار شد تا بقایای محیط کشت حذف شود. به رسوب باکتری مقدار ۵۰ میکرولیتر از محلول گلوتارآلدهید و بافر فسفات (۱M، pH7. 2) اضافه شد و رسوب باکتری‌ها کاملاً حل شد. لوله‌های آزمایش حاوی باکتری‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق سپس به مدت یک شب در دمای ۴ نگهداری شدند. در روز بعد پس از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه، مایع روشناور دور ریخته شد و شستشو با اتانول به شرح زیر انجام می‌شود: (۱) اتانول ۵۰٪ به مدت یک ساعت و نیم در دمای $-20^{\circ}C$ (۲) اتانول ۷۰٪ به مدت یک ساعت و نیم در دمای $-20^{\circ}C$ (۳) اتانول ۸۵٪ به مدت یک ساعت در دمای $4^{\circ}C$ (۴) اتانول ۹۵٪ به مدت یک ساعت در دمای $4^{\circ}C$ (۵) اتانول ۹۵٪ به مدت یک شب در دمای $4^{\circ}C$ (۶) اتانول ۱۰۰٪ به مدت یک شب در دمای $4^{\circ}C$ (۷) اتانول ۱۰۰٪ به مدت یک شب در دمای $4^{\circ}C$ (۸) اتانول ۱۰۰٪ به مدت ۲-۱ ساعت در دمای اتاق. پس از آخرین مرحله شستشو رسوب باکتری به مدت ۳-۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا کاملاً خشک شود. پس از تثبیت باکتری، مراحل آماده سازی باکتری برای میکروسکوپ الکترونی انجام شد. برای این کار از دستگاه Desk sputter coater-DSR1 با پوشش نانو ساختار طلا استفاده شد. پس از پوشش سطح سلول باکتری با طلا، از میکروسکوپ الکترونی مدل / FE SEM Mira3 Lmu و HV= ۲۰ kV برای عکس‌برداری از سطح سلول باکتری استفاده شد.

- شناسایی باکتری در سطح گونه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی

توانایی رشد در دماهای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد و همچنین توانایی رشد در pH۹/۶ بر اساس روش اسنیت و همکاران، توانایی رشد در غلظت ۶/۵ درصد کلریدسدیم، تست حرکت در محیط آگار بر اساس روش Tittsler and (Sandholzer 1936)، تولید اسید از کربوهیدرات‌های مختلف در محیط نوترینت[3] و فنول رد به عنوان معرف رنگی و ۲ درصد کربوهیدرات بر اساس روش Torres-Llanez (۲۰۰۶) برای تمامی کلونی‌های انتخاب شده صورت گرفت.

برای انجام آزمون تخمیر قندها، از قندهای گلوکز، ملی‌بیوز، سوربیتول، رافینوز، لاکتوز، ساکارز، زایلوز، ترهالوز، فروکتوز،گالاکتوز، آرابینوز و مانیتول استفاده شد. از هر یک از قندهای یاد شده مقدار ۲ درصد به هریک از لوله‌های حاوی محیط نوترینت اضافه شد. سپس محیط کشت مایع پس از تلقیح با باکتری و افزودن فنول رد به عنوان معرف، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. تبدیل رنگ ارغوانی به رنگ زرد نشانه تخمیر قند و تولید اسید در نظر گرفته شد (Torres-Llanez *et al.*, 2006). برای آزمون تولید گاز، از تخمیر قند از لوله‌های دورهام استفاده شد. تجمع حباب هوا در لوله‌های دورهام مثبت بودن آزمون تولید گاز حاصل از تخمیر قند را نشان می‌دهد (Kelly *et al.*, 1998). آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم[2] به کمک معرف نین هیدرین[3] بر اساس روش Collins و همکاران (۲۰۰۴) صورت گرفت. از باکتری انتروکوکوس فکالیس ATCC29212 به عنوان شاهد مثبت و از باکتری لئوکونوستوک مزنتروئیدس[4] به عنوان شاهد منفی در آزمون هیدرولیز هیپورات سدیم استفاده شد.

- شناسایی باکتری‌ها با استفاده از روش FTIR

با توجه به نتایج غربالگری اولیه، از هر دو دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد ۴ نمونه برای انجام آزمون طیف سنجیFTIR انتخاب شدند و با اسامی SD93101، SD93919 (کلونی‌های رشد کرده در ۲۸ درجه سانتی‌گراد) LUB93929 و LUB93101 (کلونی‌های رشد کرده در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نامگذاری شدند. از چند جنس شناخته شده از باکتری‌های اسیدلاکتیک که عموما در شیر وجود دارند به عنوان باکتری شاهد مانند لئوکونوستوک مزنتروئیدس، لاکتوباسیلوس روتری[5]، لاکتوکوس گراویه[6] و انتروکوکوس فکالیس برای شناسایی باکتری‌ها استفاده شد.

[1] Nutrient Broth
[2] Hippurate Sodium
[3] Ninhydrin
[4] *Leuconostoc Mesentroides*
[5] *Lactobacillus reuteri*
[6] *Lactococcus garvieae*

- **آماده سازی نمونه**

ابتدا باکتری‌ها در محیط MRS مایع کشت داده شدند. پس از رشد باکتری‌ها به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، فالکون حاوی باکتری به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب حاصل ۵ ml آب مقطر استریل اضافه شد. پس از حل کردن رسوب، بار دیگر سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰g انجام شد و سلول‌ها سه بار دیگر با آب استریل شستشو شدند تا رسوب باکتری عاری از محیط کشت شود. پس از آخرین مرحله‌ی شستشو، با خارج نمودن کامل مایع رویی درب میکروتیوب‌ها باز گذاشته شد و به مدت یک شب در ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد درون آون قرار داده شدند تا آب آنها تبخیر و کاملا خشک شود.

- **تهیه نمونه برای FTIR**

مقدار حدودا ۰/۱ گرم از رسوب خشک باکتری با مقدار مساوی از پتاسیم برماید (KBr) در هاون مخصوص مخلوط و به صورت پودر در آورده شد. این پودر بر روی دیسک مخصوص کوچکی قرار داده شد و دیسک به کمک جک مخصوص تحت فشار قرار گرفت تا پودر به شکل لایه نازکی روی دیسک تثبیت شود (Davis & Mauer, 2010; Zhao *et al.*, 2006).

- **طیف سنجی FTIR**

پس از آماده سازی نمونه، دیسک در محفظه مخصوص دستگاه طیف سنج SHIMADZU IR 10. 1 قرار داده شد و طیف حاصل از سنجش مقدار عبور اشعه در محدوده طول موج ۴۰۰۰-۴۰۰ بر سانتی ثبت گردید.

- **بررسی و پردازش داده‌های FTIR**

پردازش‌های مختلفی را می‌توان روی طیف‌های IR مربوط به FTIR انجام داد که باعث بهبود ویژگی‌های ظاهری طیف‌ها شده و به تجزیه و تحلیل و تفسیر طیف‌ها کمک می‌کنند (Brain & Smith, 1996). پردازش طیف‌ها عموماً بوسیله نرم‌افزارهایی صورت می‌گیرند که همراه دستگاه سنجش FTIR ارائه می‌شوند. در این پژوهش از نرم‌افزار IR SLUTION مربوط به شرکت سازنده دستگاه FTIR برای انجام پردازش داده‌ها استفاده شد. اصلاح خطوط پایه سبب کاهش فرکانس و نویز و افزایش محتوای مفید و قابل استفاده طیف‌ها می‌شود (Brain & Smith, 1996; Al-Qadiri *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2004). همچنین مشتق اول و دوم طیف‌ها باعث کاهش تنوع حاصل از تکرار پیک‌ها، کاهش تغییرات خطوط پایه، حل مشکل هم پوشانی پیک‌ها و افزایش و تقویت تغییرات طیف‌ها می‌شود (Al-Qadiri *et al.*, 2008 ;Brain & Smith, 1996; Lin *et al.*, 2004). از مشتق دوم بیشتر برای رده‌بندی باکترها استفاده می‌شود (AL-Holy *et al.*, 2006). در این پژوهش از مشتق دوم داده‌ها استفاده شد. از طرف دیگر، نرمال سازی داده‌ها باعث از بین بردن تنوع در طول مسیر طیف‌ها و کاهش تفاوت بین طیف‌های اندازه گیری شده از یک نمونه واحد می‌شود. نرمال‌سازی طیف‌ها بیشتر بر اساس پیک‌های قوی و یا پیک‌های مورد نظر انجام می‌شود. معمولاً از پیوندهای آمیدی ۱ به عنوان پیک استاندارد برای نرمال سازی استفاده می‌شود (Maquelin *et al.*, 2002). نرمال سازی بیشتر برای مواقعی کاربرد دارد که باکتری‌های مورد مطالعه در فازهای رشدی مختلف قرار دارند. نرمال سازی همچنین یکی از شروط مهم و لازم برای تجزیه و تحلیل آماری پیشرفته طیف‌های باکتریایی است (Al-Qadiri *et al.*, 2008; Amiali *et al.*, 2008a).

- **تجزیه و تحلیل آماری**

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی را به‌طور معمول قبل از تجزیه کلاستر انجام می‌دهند تا اهمیت نسبی متغیرهایی مشخص شوند و بعداً از آنها در گروه‌بندی تجزیه کلاستر استفاده گردد. در این مطالعه از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی Pearson (۱۹۰۱) استفاده شد. در تجزیه کلاستر داده‌های طیف‌های FTIR از الگوریتم وارد[1] برای یافتن فاصله خوشه‌ها استفاده گردید (Ward, 1963). از نرم افزارهای آماری مختلفی برای مقایسه داده‌های پیچیده طیف‌های باکتریایی با رویکرد آماری چند متغیره‌ی همانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و تجزیه کلاستر استفاده می‌شود. در این پژوهش از نرم افزار Minitab نسخه ۱۷ استفاده شد.

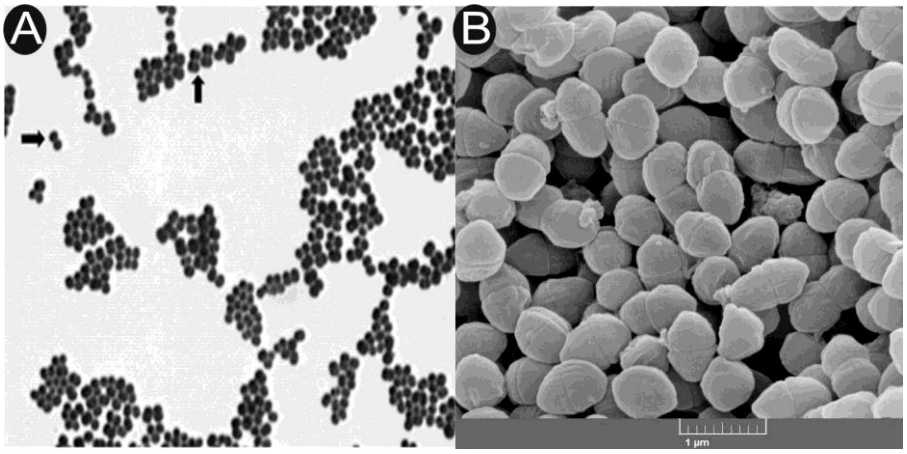
[1] wards

یافته‌ها

- آزمون‌های بیوشیمیایی

باکترهای اسیدلاکتیک گرم مثبت، کاتالاز منفی و کوکسی یا میله‌ای شکل به صورت تکی، دوتایی یا چندتایی هستند (Salminen & Von Wright, 2004). بر این اساس، از تعداد ۷۰ باکتری انتخابی از کشت اولیه، تعداد ۴۰ کلونی گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند که به عنوان باکتری اسیدلاکتیک شناخته شدند. مشاهدات میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۱۰۰× حضور باکتری‌های کوکسی شکل را در دسته‌های دوتایی و چندتایی نشان داد (شکل ۱A). تصاویر میکروسکوپ الکترونی وجود باکتری‌های کوکسی شکل را که در حال تقسیم هستند، نشان داد (شکل ۱B). همانطوری که در شکل ۱Bدیده می شود، باکتری‌ها در جریان تقسیم ظاهری بامیه‌ای شکل به خود می‌گیرند.

از میان ۷۰ کلونی باکتریایی جداسازی شده، تعداد۳۳ باکتری هموفرمنتیتیو، کوکسی شکل، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. این باکتری‌ها قادر بودند تا به خوبی در دمای ۱۵ و ۴۲ درجه‌سانتی‌گراد در محیطی با pH ۹/۶ و ۶/۵ درصد نمک کلرید سدیم رشد کنند. همچنین تعداد ۱۲ باکتری (۱۷/۱٪) باکتری‌های هموفرمنتیتیو، کوکسی شکل، گرم مثبت، کاتالاز منفی که رشد متغیر و ضعیفی در دماهای ۱۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد از خود نشان می‌دهند و توانایی رشد در pH۹/۶ و محیط حاوی ۶/۵ درصد نمک کلرید سدیم را نداشتند. جدول ۱ نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی را برای باکتری‌ها در دمای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی گراد نشان می‌دهد. همان طوری که در جدول ۱ مشاهده می شود، هردو گروه از باکتری‌ها قادر به تولید گاز Co_2 از گلوکز نبودند. همچنین هر دو گروه از باکتری‌ها نتواستند قندهای زیلوز و آرابینوز را تخمیر نمایند. همچنین باکتری‌های گروه دوم توانستند هیپورات سدیم را هیدرولیز کنند (جدول ۱). بر اساس این نتایج، ایزوله‌های باکتری‌های گروه اول به اسامی LUB93929 و LUB93101 و ایزوله‌های باکتری‌های گروه دوم به اسامی SD93101 و SD93919 نام‌گذاری شدند. بر اساس یافته‌های تحقیقاتی، احتمالاً چنین باکتری‌هایی به جنس استرپتوکوکوس تعلق داشته باشند. برای شناسایی باکتری‌ها در سطح گونه از آزمون‌های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها، هیدرولیز هیپورات سدیم و آزمون حرکت استفاده شد. مقایسه‌ی این داده‌ها با نتایج مطالعات Manero and Blanch (۱۹۹۹) و Collins و همکاران (۲۰۰۴) نشان می‌دهد که ایزوله‌های گروه اول از جنس انتروکوکوس (LUB93929 و LUB93101) به گونه فکالیس[1] تعلق دارند. همچنین با توجه به توانایی هیدرولیز هیپورات سدیم توسط ایزوله‌های گروه دوم (LUB93929 و LUB93101) این ایزوله‌ها به جنس استرپتوکوکوس از گونه دیورسی[2] تعلق دارند.



شکل ۱- (A)تصویر میکروسکوپ نوری (۱۰۰×) و (B) تصویر میکروسکوپ الکترونی باکتری‌های استخراج شده از شیر الاغ. پیکان‌ها زنجیره‌های دوتایی و چندتایی باکتری‌های کوکسی شکل را نشان می‌دهند.

جدول ۱- نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی باکتری‌ها در دماهای ۲۸ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد

[1] *Faecalis* [2] *Devriesei*

		۳۷ درجه‌سانتی‌گراد	۲۸ درجه‌سانتی‌گراد
آزمون گرم		+	+
آزمون کاتالاز		+	+
تولید CO_2 از گلوکز		–	–
رشد در دما ($^{\circ}C$)	۱۵	+	+
رشد در دما ($^{\circ}C$)	۴۲	+	W
رشد در pH ۹/۶		+	-
رشد در ۶/۵NaCl درصد		+	-
تولید اسید از تخمیر قند	لاکتوز	+	+
	مانیتول	+	+
	ساکارز	+	+
	ملی‌بیوز	-	+
	گالاکتوز	+	+
	آرابینوز	-	-
	ترهالوز	+	+
	فروکتوز	+	+
	زایلوز	-	-
	گلوکز	+	+
	سوربیتول	+	+
	رافینوز	-	+
آزمون حرکت		+	-
هیدرولیز هیپورات سدیم		+	+

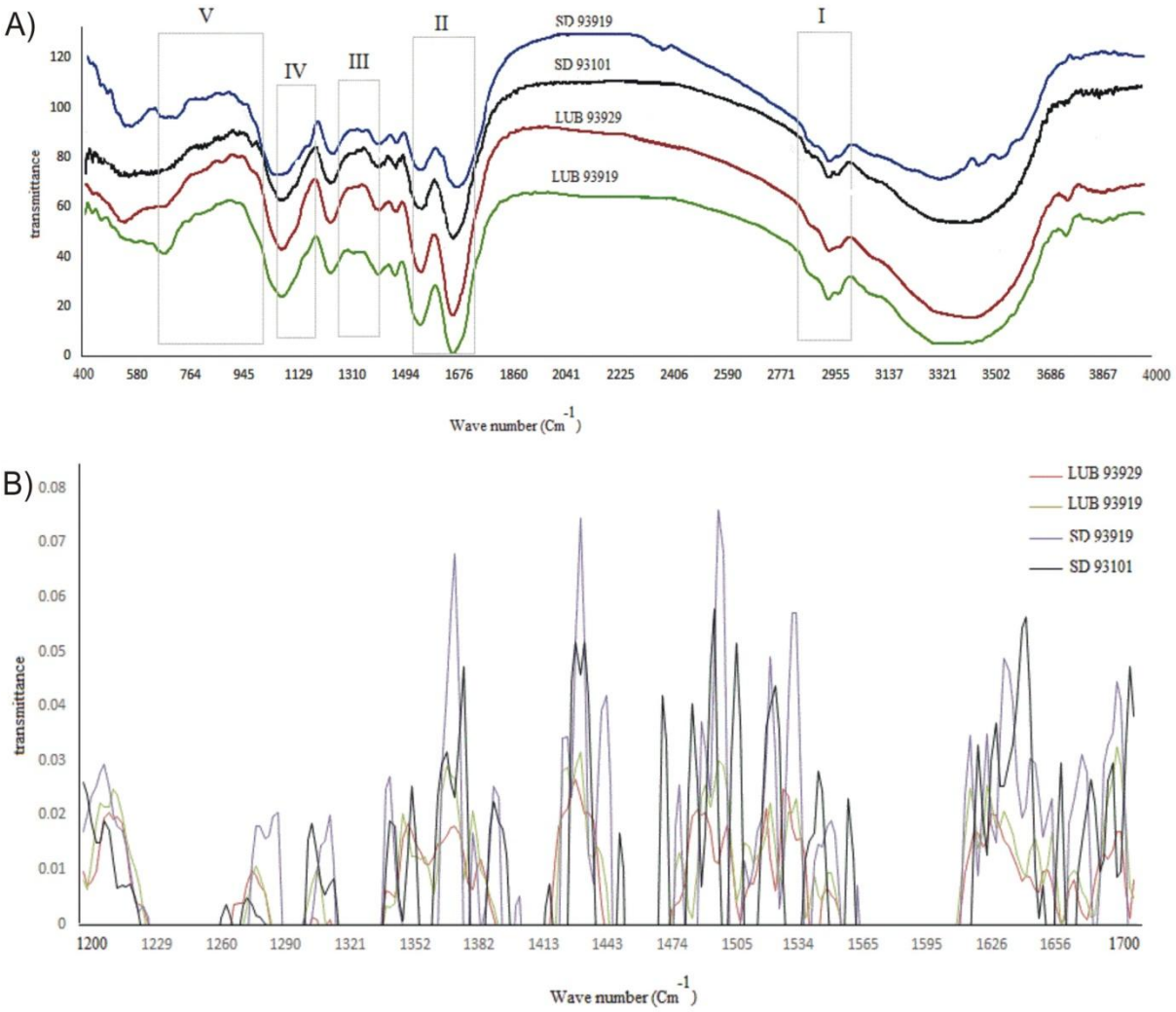
W: رشد ضعیف

- آزمون FTIR

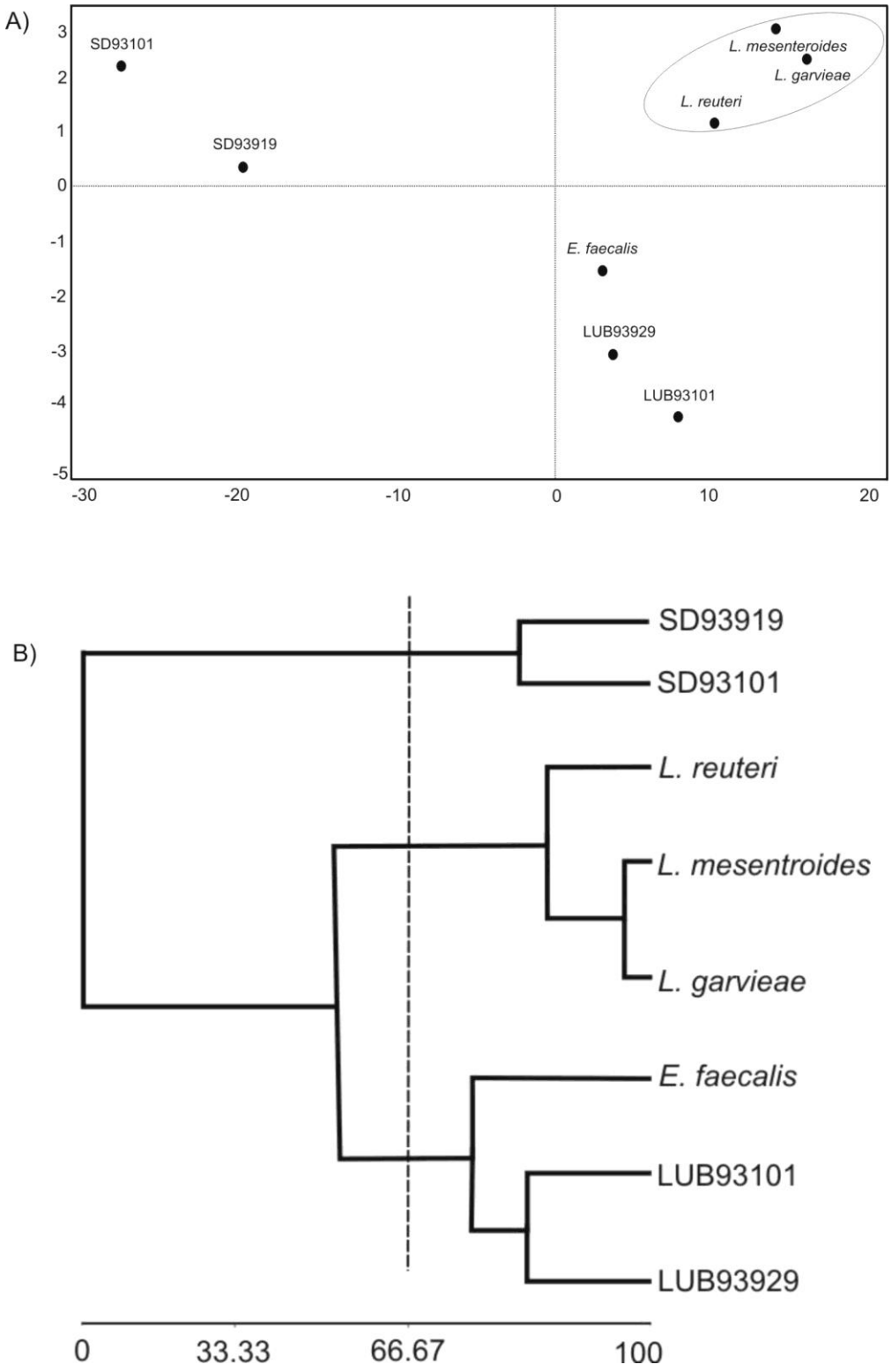
در نبود آب، پنج ناحیه جذبی در طیف‌هایIR در شناسایی باکتری‌ها کاربرد دارند (شکل ۲A). طیف جذبی هر یک از این نواحی به یکی از ماکرومولکول‌های حیاتی سازنده‌ی بدن باکتری‌ها اختصاص دارد. ناحیه موسوم به ناحیه انگشت‌نگاری ($۷۰۰–۹۰۰Cm^{-1}$) برای تشخیص و تمایز باکتری‌ها در سطح نژاد بسیار مهم و مورد توجه است (Naumann, 2000; Naumann *et al.*, 1991). پس از انجام طیف سنجی و تصحیح طیف‌ها، شکل کلی طیف‌های حاصل در شکل ۲A نشان داده شده‌اند.

همانطور که در شکل ۲A مشاهده می‌شود، طیف‌های FTIR در بیشتر نواحی با همدیگر همخوانی دارند. همچنین باکتری‌ها دارای پیک‌های خاصی با اختلاف‌های معین هستند. طیف‌های FTIR به خوبی توانسته‌اند تا باکتری‌های جنس انتروکوکوس و استرپتوکوکوس را به خوبی از همدیگر تفکیک کنند به طوری که دو گروه باکتری در تمام مناطق پنج گانه با هم اختلاف دارند(شکل ۲B. با مشتق گیری از طیف‌ها FTIR بخش‌هایی از آن‌ها حذف شد. در نواحی باقی‌مانده بخش‌های مشترک و عدد موج‌های ارزشمندی برای مقایسه طیف‌های باکتری‌های مختلف به دست آمد (شکل ۲B). همانطوری که مشاهده

می‌شود، بیشترین اختلاف‌ها در ناحیه ۱۲۰۰– ۱۷۰۰cm-1 دیده شد و بر همین اساس آنالیزهای آماری روی اطلاعات این ناحیه انجام شد (شکل ۲B). برای انجام آنالیزهای آماری، ابتدا طیف‌های IR توسط نرم افزار مربوطه نرمال شدند و پس از استخراج اطلاعات عددی هر طیف از نرم افزار IR SLUTION، آنالیزهای آماری انجام شود. نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی در ۳A نشان داده شده است. همچنان که مشاهده می‌شود دو باکتری SD93101 و SD93919 کاملا نزدیک هم قرار گرفتند و از باکتری-هایی که به عنوان شاهد به‌کار رفته‌اند، کاملا مجزا قرار گرفتند. همچنین باکتری‌های LUB93929 و LUB93101 نیز کاملا به هم نزدیک بوده و در مجاورت باکتری انتروکوکوس فکالیس شاهد در یک گروه قرار گرفته‌اند. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر داده‌ها با استفاده از الگوریتم وارد به صورت دندوگرامی در ۵ نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، هم سو با نتایج تجزیه به مولفه های اصلی، باکتری‌های LUB93929، LUB93101 و انتروکوکوس فکالیس در یک کلاستر قرار گرفته‌اند. همچنین باکتری‌های SD93101 و SD93919 نیز خود در یک کلاستر مجزا قرار دارند و به هیچ‌یک از باکتری‌های دیگر در این مطالعه شباهتی ندارند. همچنین باکتری‌های لئوکونوستوک مزنتروئیدس، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوکوکوس گراویه در یک خوشه قرار گرفته‌اند (شکل ۳B).



شکل ۲– (A) شکل کلی طیف‌های حاصل از باکتری‌های LUB93929 ، LUB93101، SD93101 و SD93919 در محدوده‌ی Cm^{-1} ۴۰۰۰–۴۰۰(B) . مشتق دوم از طیف‌های جذبی باکتری‌های LUB93929 ، LUB93101،SD93101 و SD93919 در محدوده‌ی cm^{-1} ۱۲۰۰–۱۷۰۰



شکل۳- (A) نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های FTIR باکتری‌های لوکونستوک مزنتروئیدس، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوکوکوس گراویه، انتروکوکوس فکالیس، LUB93929، LUB93101، SD93101 و SD93919. (B) نتایج حاصل از تجزیه کلاستر داده‌های FTIR برای باکتری‌های لوکونوستوک مزنتروئیدس، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوکوکوس گراویه، انتروکوکوس فکالیس،LUB93929 ، LUB93101،SD93101 وSD93919

بحث

شیر الاغ به دلیل وجود مواد آنتی باکتریال دارای تنوع و فلور میکروبی فقیری است (Carminati *et al.*, 2014; Nazzaro *et al.*, 2008; Tidona *et al.*, 2011). از این‌رو، شناسایی باکتری در اینگونه زیستگاهها اگرچه تا حدودی راحت است، ولی به دلیل شباهت زیاد آنها از نظر الگوی تخمیر قندها، آزمون‌های بیوشیمیایی به سختی می‌توانند بین باکتری‌ها تمایز قائل شوند. در این گونه موارد، پژوهشگران برای اطمینان از شناسایی صحیح باکتری‌ها از روش‌های مولکولی همانند توالی‌یابیrRNAی ۱۶S استفاده می‌کنند. هزینه و صرف وقت زیاد از جمله معایب این روش‌هاست. در مقابل، نتایج این مطالعه نشان داد که روش FTIR به دلیل دقت قابل قبول و صرف هزینه و وقت کمتر در شناسایی اولیه باکتری‌ها می‌تواند جایگزین روش‌های بیوشیمیایی شده و یا حداقل در غربال اولیه باکتری‌ها مورد استفاده قرار گیرد. با این حال، مهمترین عیب استفاده از FTIR برای شناسایی باکتری‌ها، عدم وجود پایگاه داده‌ای و بانک اطلاعاتی برای داده‌های FTIR است و اکثر پژوهشگران از برخی باکتری‌های عمومی و در دسترس به عنوان باکتری مدل استفاده می‌کنند. بر اساس مطالعات صورت گرفته، طیف FTIR باکتری‌های یک جنس با هم یکسان بوده و با طیف سایر باکتری‌ها از سایر جنس‌ها متفاوت است (Dziuba *et al.*, 2007). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی برای غربال اولیه و شناسایی در سطح جنس و استفاده از باکتری‌ها در سطح جنس به عنوان باکتری مدل در FTIR در شناسایی باکتری بسیار مفید است. نتایج آنالیزهای آماری این مقاله نشان داد که باکتری‌های LUB93929 و LUB93101 مربوط به یک جنس و گونه و باکتری‌های SD93101 و SD93919 به هیچ‌یک از باکتری‌های جنس انتروکوکوس، لئوکونوستوک، لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکوس تعلق ندارد، بلکه خود به جنس و گونه‌ی جدیدی تعلق دارند. برای شناسایی دقیق‌تر باکتری‌های گروه دوم، از توالی‌یابی ناحیه rRNAی ۱۶S استفاده شد. نتایج توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنی بر اساس داده‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که این باکتری‌ها متعلق به جنس استرپتوکوکوس و گونه‌ی دیورسی هستند (نتایج نمایش داده نشده است). این موضوع نشان می دهد که می توان از تکنیک FTIR برای غربال اولیه باکتری‌ها استفاده نمود. تاکنون این تکنیک توانسته است توانایی خود را در تمایز گونه‌های بسیار نزدیک به هم لاکتوباسیل به خوبی نشان دهد (Oust *et al.*, 2004). با این حال، Dziuba و همکاران نتوانستند به کمک این تکنیک گونه‌های لاکتوباسیل را به کمک FTIR از هم تمیز دهند. باکتری استرپتوکوکوس دیورسی اولین با در سال ۲۰۰۴ از حفره‌ی دهانی اسب جداسازی شد (Collins *et al.*, 2004) که با توجه به جداسازی این باکتری از شیر الاغ در این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که این باکتری در شیر اسب‌سانان زندگی کرده و احتمالاً از این طریق وارد حفره دهانی این حیوانات می‌شود. همچنین بر اساس اطلاعات مربوط به آنالیزهای بیوشیمیایی بخصوص الگوی تخمیر قندها، ایزوله‌های LUB93929 و LUB93101 به جنس انتروکوکوس و گونه فکالیس تعلق دارند که تجزیه و تحلیل داده‌های FTIR نیز این موضوع را تایید نمود.

نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این مطالعه، روش FTIR می‌تواند جایگزین مناسبی برای آزمون‌های بیوشیمیایی تخمیر قندها در شناسایی باکتری‌ها در سطح گونه باشد.

منابع

Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J., Glover, R. & Tano-Debrah, K. (2010). Microbiological characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, Nunu. Nature and Science, 8, 178-187.

AL-Qadiri, H. M., Al-alami, N. I., Lin, M., Al-holy, M., Cavinato, A. G. & Rasco, B. A. (2008). Studying of the bacterial growth phases using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 16, 73-89.

Amiali, N., Mulvey, M., Berger-Bächi, B., Sedman, J., Simor, A. & Ismail, A. (2008a). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus. Journal of antimicrobial chemotherapy, 61, 95-102.

Amiali, N. M., Mulvey, M. R., Berger-Bächi, B., Sedman, J., Simor, A. E. & Ismail,

A. A. (2008b). Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy for the rapid identification of glycopeptide-intermediate Staphylococcus aureus. Journal of antimicrobial chemotherapy, 61, 95-102.

Becker, K., Al Laham, N., Fegeler, W., Proctor, R. A., Peters, G. & von Eiff, C. (2006). Fourier-transform infrared spectroscopic analysis is a powerful tool for studying the dynamic changes in Staphylococcus aureus small-colony variants. Journal of clinical microbiology, 44, 3274-3278.

Brain, C. & Smith, B. (1996) Fundamentals of Fourier transform infrared spectroscopy in, Boca Raton: CRC Press,

Burgula, Y., Khali, D., Kim, S., Krishnan, S., Cousin, M., Gore, J., Reuhs, B. & Mauer, L. (2006). Detection of Escherichia coli O157: H7 and Salmonella typhimurium using filtration followed by Fourier-transform infrared spectroscopy. Journal of Food Protection, 69, 1777-1784.

Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M., Rossetti, L., Meucci, A. & Giraffa, G. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. Letters in applied microbiology, 59, 299-305.

Collins, M. D., Lundstrm, T. r., Welinder-Olsson, C., Hansson, I., Wattle, O., Hudson, R. A. & Falsen, E. (2004). Streptococcus devriesei sp. nov., from Equine Teeth. Systematic and applied microbiology, 27, 146-150.

Davis, R. & Mauer, L. (2010). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy: a rapid tool for detection and analysis of foodborne pathogenic bacteria. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology, 2, 1582-1594.

Dziuba, B. o., Babuchowski, A., NaÅ, Ä™cz, D. & Niklewicz, M. (2007). Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis. International dairy journal, 17, 183-189.

Filip, Z., Herrmann, S. & Kubat, J. (2004). FT-IR spectroscopic characteristics of differently cultivated Bacillus subtilis. Microbiological research, 159, 257-262.

Fujisawa, T. & Mitsuoka, T. (1996). Homofermentative Lactobacillus species predominantly isolated from canine feces. Journal of veterinary medical science, 58, 591-593.

Kelly, W. J., Davey, G. P. & Ward, L. J. (1998). Characterization of lactococci isolated from minimally processed fresh fruit and vegetables. International journal of food microbiology, 45, 85-92.

Kirschner, C., Maquelin, K., Pina, P., Thi, N. N., Choo-Smith, L. P., Sockalingum, G., Sandt, C., Ami, D., Orsini, F. & Doglia, S. (2001). Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. Journal of clinical microbiology, 39, 1763-1770.

Kuhm, A. E., Suter, D., Felleisen, R. & Rau, J. (2009). Application of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for the identification of Yersinia enterocolitica on species and subspecies level. Applied and Environmental Microbiology.

Lamprell, H., Mazerolles, G., Kodjo, A., Chamba, J., Noel, Y. & Beuvier, E. (2006). Discrimination of Staphylococcus aureus strains from different species of Staphylococcus using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. International journal of food microbiology, 108, 125-129.

Levine, S., Stevenson, H. J., Chambers, L. A. & Kenner, B. A. (1953). Infrared spectrophotometry of enteric bacteria. Journal of bacteriology, 65, 10.

Lin, M., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Kang, D. -H., Cavinato, A. G., Huang, Y. & Rasco, B. A. (2004). Discrimination of intact and injured Listeria monocytogenes by Fourier transform infrared spectroscopy and principal component analysis. Journal of agricultural and food chemistry, 52, 5769-5772.

Lin, M., M., A. H., Al-Qadiri, H., Chang, S., Kang, D. H., Rodgers, B. D. & Rasco, B. A. (2007). Phylogenetic and spectroscopic analysis of Alicyclobacillus isolates by 16S rDNA sequencing and mid-infrared spectroscopy. Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety, 1, 11-17.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. & Parker, J. (2004) Brock biología de los microorganismos in 10th ed; Pearson Educacion: S. A., Madrid, Espana.

Manero, A. & Blanch, A. R. (1999) Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Applied and environmental microbiology 65(10), 4425-4430.

Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Van den Braak, N., Endtz, H. P., Naumann, D. & Puppels, G. (2002).

Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. Journal of Microbiological Methods, 51, 255-271.

Morelli, L. (2001). Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria, effects and function on nutrition. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation on health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with lactic acid bacteria[Online] Food and Agricultural Organization of the United Nations, New York, NY ftp://ftp fao org/es/esn/food/Morelli pdf.

Naumann, D. (2000). Infrared spectroscopy in microbiology. Encyclopedia of analytical chemistry.

Naumann, D., Helm, D. & Labischinski, H. (1991). Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature, 351, 81-82.

Naumann, D., Keller, S., Helm, D., Schultz, C. & Schrader, B. (1995). FT-IR spectroscopy and FT-Raman spectroscopy are powerful analytical tools for the non-invasive characterization of intact microbial cells. Journal of Molecular structure, 347, 399-405.

Nazzaro, F., Anastasio, M., Fratianni, F. & Orlando, P. (2008). Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from raw donkey milk. Intern J Prob Preb, 3, 374.

Oberreuter, H. (2001) FT-IR spectroscopic identification and infraspecific diversity of coryneform bacteria in relation to 16S rDNA sequence analysis. Thesis. Technische Universitat Munchen.

Oust, A., MÃ¸retrÃ¸, T., Kirschner, C., Narvhus, J. A. & Kohler, A. (2004). FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. Journal of microbiological methods, 59, 149-162.

Person, K. (1901) On lines and planes of closest fit to systems of points in space. Philosophical magazine, 2, 559-572.

Rebuffo, C. A., Schmitt, J., Wenning, M., von Stetten, F. & Scherer, S. (2006). Reliable and rapid identification of Listeria monocytogenes and Listeria species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. Applied and environmental microbiology, 72, 994-1000.

Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of Lactobacillus. Applied and environmental microbiology, 65, 3763-3766.

Riddle, J. W., Kabler, P. W., Kenner, B. A., Bordner, R. H., Rockwood, S. W. & Stevenson, H. J. (1956). Bacterial identification by infrared spectrophotometry. Journal of bacteriology, 72, 593.

Salminen, S. & Von Wright, A. (2004) Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press.

Schmitt, J., Beekes, M., Brauer, A., Udelhoven, T., Lasch, P. & Naumann, D. (2002). Identification of scrapie infection from blood serum by Fourier transform infrared spectroscopy. Analytical chemistry, 74, 3865-3868.

Tannock, G. (2004). A special fondness for lactobacilli. Applied and environmental microbiology, 70, 3189-3194.

Tidona, F., Sekse, C., Criscione, A., Jacobsen, M., Bordonaro, S., Marletta, D. & Vegarud, G. E. (2011). Antimicrobial effect of donkey milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. International dairy journal, 21, 158-165.

Tittsler, R. P. & Sandholzer, L. A. (1936). The use of semi-solid agar for the detection of bacterial motility. Journal of Bacteriology, 31, 575.

Torres-Llanez, M., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M., Mazorra-Manzano, M. & González-Córdova, A. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. Food control, 17, 683-690.

Ward, J. H. (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. Journal of the American statistical association, 58, 236-244.

Zhao, H., Parry, R. L., Ellis, D. I., Griffith, G. W. & Goodacre, R. (2006). The rapid differentiation of Streptomyces isolates using Fourier transform infrared spectroscopy. Vibrational spectroscopy, 40, 213-218.