مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *لاکتوباسیلوس* ها از لبنیات سنتی روستاهای استان فارس و بررسی پتانسیل پروبیوتیکی آنها

ندا زمانی[۱]، عباس اخوان سپهی[۲*]، محمد رضا فاضلی[۳]، فرید شریعتمداری[٤]

۱- دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاداسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۳- استاد، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

٤- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰ /۰٦/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۰۹/۱۵

کلمات کلیدی:

پروبیوتیک،

لاکتوباسیلوس،

جداسازی،

16S rRNA.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.41

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5

* مسئول مکاتبات:

akhavansepahy@gmail.com

چکیده

لاکتوباسیلوس ها شناخته شده ترین سویه های دارای خواص پروبیوتیکی می باشند که اثر به سزایی در ارتقا سلامت دستگاه گوارش دارند. هدف از این مطالعه، جداسازی و بررسی خواص پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس* های بومی موجود در لبنیات استان فارس می باشد. از نمونه های لبنیات، باسیل های گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی و توسط روش های شیمیایی بررسی شدند. برای ارزیابی خواص پروبیوتیکی جدایه ها، میزان رشد آنها در pHهای مختلف اسیدی و قلیایی، غلظت های مختلف نمک صفراوی و نمک NaCl مورد سنجش قرار گرفت. فعالیت ضد میکروبی جدایه ها بر روی باکتری های پاتوژن با روش چاهک گذاری بررسی و همچنین تست حساسیت به آنتی بیوتیک های رایج با روش دیسک دیفیوژن انجام شد. سویه های بهینه، توسط توالی یابی ژن 16S rRNA از لحاظ مولکولی شناسایی شدند. از مجموع ۳٦ سویه‌ی گرم مثبت و کاتالاز منفی ۱۰ سویه از نظر بیوشیمیایی شبیه به لاکتوباسیلوس ها بودند که ۵ سویه توانایی رشد در pH۳ تا ۹ و غلظت‌های مختلف نمک صفراوی و نمک NaCl را داشتند. این باکتری‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های متداول بوده و در برابر آنتی بیوتیک‌های کلیندامایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین مقاوم بودند. سویه‌ی M3و Y4 دارای خواص پروبیوتیکی بهتری بودند. ارزیابی مولکولی نشان داد این دو سویه به ترتیب دارای شباهت ۱۰۰ ٪ و ۹۹,۹۸ ٪ با سویه های *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* هستند. در نتیجه مشخص شد که این دو سویه*لاکتوباسیلوس* با خواص پروبیوتیکی تایید شده در لبنیات سنتی استان فارس موجود هستند که می توان از آنها در صنایع غذایی لبنی و جهت ارتقا کیفیت غذای دام و طیور استفاده کرد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]

[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

۱- مقدمه

گروه باکتریهای اسید لاکتیک(LAB[1]) نقش مهمی در فرآیندهای تخمیر در صنایع غذایی و لبنیات دارند. در میان باکتری های اسید لاکتیک مختلف، لاکتوباسیلوسها عمدتا برای تولید اسید لاکتیک استفاده میشوند، اما آنها مسئول تولید اسیدهای آلی، گاز، طعم، عطر و بافت در غذا و محصولات لبنی نیز هستند. این باکتریها همچنین مزایای درمانی و سلامتی را در مصرف کنندگان افزایش میدهند. خواص ارتقاء دهنده سلامتی در باکتری های اسید لاکتیک به ویژگیهای پروبیوتیکی آنها مربوط میشود[۱]. پروبیوتیکها میکروارگانیسمهای زنده ای هستند که میتوانند فواید سلامتی را برای میزبان در صورت مصرف در مقادیر تعیین شده مناسب، ارائه دهند. در حقیقت، اخیراً مصرف پروبیوتیکها توسعه یافته است و آنها میتوانند میکروبیوم روده انسان را که در اثر عدم تعادل میکروبی آسیب دیده است، متعادل و ترمیم کنند[۲]. در سالهای اخیر با ظهور مقاومت آنتی بیوتیکی، تأکید زیادی بر بررسی پروبیوتیکها و محصولات آنها به عنوان جایگزین آنتی بیوتیکها شده است. فعالیت آنتاگونیستی پروبیوتیکها در برابر عوامل بیماریزا با مجموعه ای از مکانیسمها ایجاد میشود که شامل حذف رقابتی عوامل بیماریزا، افزایش عملکرد سدرودهایو تولید ترکیبات ضدمیکروبی موثر مانند پپتیدها میشود[۳]. بیشتر باکتری های اسید لاکتیک به عنوان میکروارگانیسمهای " ایمن" طبقه بندی میشوند زیرا غیربیماریزا و مناسب برای فرایندهای تکنولوژیکی و صنعتی هستند [٤]. آنها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت و بدن اسپور هستند که اسید لاکتیک در آنها به عنوان محصول نهایی در تخمیر کربوهیدرات‌ها تولید می‌شود. امروزه نیاز فزاینده ای به گونه های جدید باکتری های اسید لاکتیک وجود دارد که ویژگیهای پروبیوتیک را ارائه میدهند و بر رفاه و سلامت انسان و حیوان تأثیر میگذارد[۵]. همچنین، LAB ها نقطه کانونی تحقیقات فشرده جهانی هستند به دلیل نقش اساسی آنها در اکثر غذاهای تخمیر شده و همچنین به دلیل توانایی که در ایجاد ترکیبات ضدمیکروبی مختلف با افزایش خواص پروبیوتیک، کاهش کلسترولسرم، تثبیت میکروفلور روده، کاهش عدم تحمل لاکتوز و تحریک سیستم ایمنی بدن دارند[٦]. مهم ترین جنس های باکتری های اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس [۷]، انتروکوکوس [۸]، استرپتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم [۹] می باشند. از ویژگی های مهم دیگر برخی از لاکتوباسیلوس ها، توان تحمل اسیدیته بالا و مقاومت به نمک ها ی صفراوی است که وجود این توانایی ها از خصوصیات پروبیوتیکی انها است[۱۰]. باکتری‌ها برای پروبیوتیک بودن باید ویژگی‌هایی از جمله قابلیت اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده، غیر تهاجمی و غیر بیماری‌زا بودن، قابلیت کلونیزه شدن در دستگاه گوارش انسان، قابلیت ممانعت از اتصال باکتری‌های پاتوژن به مخاط روده را داشته باشند[۱۱]. شناسایی، غربالگری و جداسازی LAB از محصولات طبیعی از مو ثرترین روشها برای به دست آوردن سویه های مناسب برای اهداف تجاری است[۱۲]. مقادیر زیادی از محصولات لبنی مختلف به طور سنتی از شیر نشخوارکنندگان در سراسرجهان تولید میشود. خواص و تنوع مختلف پنیرهای سنتی تولید شده از شیرخام به فلور میکروبی آنها بستگی دارد[۱۳]. به طورکلی، سویه های تجاری در تولید لبنیات سنتی استفاده نمیشوند و تولیدکنندگان لبنی سنتی عمدتا به LAB طبیعی موجود در شیر برای دستیابی به خواص اسید لاکتیک مورد نیاز تکیه میکنند[١٤]. امروزه تولید محصولات لبنی به طور عمده با استفاده از آغازگرهای تجاری مشخص، باعث شده که این محصولات نسبت به محصولات تولیدی با روشهای سنتی، از عطر و طعم مطلوبی برخوردار نباشند[۱۵]. به همین دلیل امروزه، سویه های بومی باکتری های اسید لاکتیک اهمیت ویژه ای در صنایع لبنی یافته اند چرا که این سویه ها علاوه بر آنکه دارای خصوصیات سازگاری با شرایط همان منطقه می باشند از توانایی خاص در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع فرآورده های تخمیری برخوردار هستند، بنابر این جداسازی و شناسایی سویه های بومی هر منطقه نقش بسیار مهمی در صنعت لبنیات و همچنین سلامت افراد آن جامعه بر عهده دارد[١٦]. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *لاکتوباسیلوس*های موجود در لبنیات سنتی استان فارس است. این اقدام گامی در جهت توسعه استارترها و جهت استفاده در صنایع لبنی پروبیوتیک و برای تولید محصولات سالم دارای طعم و بافت بهتر و ارتقا سطح سلامت افراد جامعه است.

1. Lactic acid bacteria

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

۲- مواد و روش ها

۲-۱-جمع آوری نمونه ها

لبنیات سنتی به تعداد ٤٠ نمونه شامل ۱۲شیر خام، ۱۵ ماستو ۱۳ پنیر از دو روستای قلات و دشتک در استان فارس در شرایط استریل جمع‌آوری و درکنار یخ به آزمایشگاه منتقل شدند، نمونه ها تا هنگام شروع آزمایش در یخچال با دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲-تهیه سوسپانسیون باکتریایی و کشت

در ابتدا جهت غنی سازی باکتری ها، نمونه های شیر، ماست و پنیر در محیط MRS broth[2] در شرایط بی هوازی و در انکوباتور CO_2دار با ۱۰٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٢٤ ساعت انکوبه شدند. سپس نمونه ها به محیط MRS agarمنتقل و در شرایط بی هوازی و در انکوباتور CO_2دار با ۱۰٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٤٨ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند.

۲-۳-جداسازی و خالص سازی

جهت خالص سازی، تمام کلنی های حاصله از لحاظ رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز مورد بررسی قرار گرفتند و باسیل های گرم مثبت و کاتالاز منفی در محیط MRS agar کشت داده شده و در شرایط بی هوازی در در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت در انکوباسیون قرار گرفتند و در نهایت کشت خالص بدست آمد[١٤].

۲-٤-شناسایی جدایه ها

جهت شناسای اولیه، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، رنگ آمیزی کپسول و اسپور، احیای نیترات، تست حرکت، سیمون سیترات، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین، تست SIM[3] و تست تولید گاز از گلوکز در محیط brothMRS حاوی لوله دورهام در شرایط بی‌هوازی انجام گرفت و همچنین تست تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف شامل آرابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکارز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، لاکتوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز، ملوزیتوز و سالیسین در محیط کشتbrothMRS انجام شد [۱۷]. برای این منظور کشت تازه (٢٤ ساعته) به محیط کشت brothMRS بدون قند دست ساز شامل عصاره گوشت ۱۰ گرم، پپتون پروتئاز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ٤ گرم، سدیم استات ۵ گرم، دی‌آمونیوم سیترات ۲گرم، منیزیوم سولفات ۰,۲ گرم، منگنز سولفات ۰,۰۵ گرم، پتاسیم فسفات ۲گرم، توویین ۸۰ یک سی‌سی و بروموکروزول پرپل ۰,۰۵ گرم با ۱٪ غلظت قند مورد نظر انجام شد و توانایی تخمیر و تولید گاز در طی ۷۲ ساعت با انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ساتنی گراد بررسی گردید[۱۸].

۲-۵-ذخیره سازی و نگهداری باکتری ها

در جهت ادامه روند آزمایشات بعدی، سویه‌های *لاکتوباسیلوس* در محیط کشت brothMRS با گلیسرول ۱۸٪ به نسبت ۱:۱استوک شد و در فریزر ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد ذخیره و نگهداری شدند[۱۹].

۳- بررسی پتاسیل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس های جداسازی شده

برای بررسی پتانسیل و خصوصیات پروبیوتیکی سویه های جدا شده تست هایی زیر بر روی آنها انجام شد.

۳-۱-تست مقاومت به pHهای اسیدی (اسید معده) و قلیایی

به منظور انجام این آزمون محیط کشتbrothMRS با pHهای مختلف از ۱ تا ۹ (تنظیم pH با HCl ۱ نرمال و سود ۵٪) تهیه گردید و سپس جدایه ها در این این محیطها کشت و در انکوباتور CO_2دار با ۱۰٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و در زمان‌های ۰ تا ۷۲ ساعت کدورت محیط های کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتری در ٦٢٠ نانومتر اندازه‌گیری و نمودار رشد آنها رسم شد[۲۰].

۳-۲-تست مقاومتبه نمک‌صفراوی

بدین منظور محیط کشت MRS broth با غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳، ۰/٦، ۰/۹ و ۱/۲ درصد ماده Oxgall و با pH ٦ تهیه شد و سپس سویه های جداسازی شده در این این محیطها کشت و در انکوباتور CO_2دار با ۱۰٪ CO_2 در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به

2. De Man, Rogosa and Shrpe
3. Sulfide-Indole-Motility

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

مدت ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس کدورت محیط کشت با دستگاه اسپکتروفوتومتری با جذب نوری ٦٢٠ نانومتر اندازه‌گیری شد و نمودار رشد آنها رسم گردید[۲۱].

۳-۳-تست تحمل غلظت های مختلف نمک NaCl

غلظت های ٤,٥ و ٦,٥ درصد نمکNaClبه محیط کشت MRS broth اضافه شد و سویه های جدا شده در این غلظت ها کشت داده شدند و در شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت در انکوباسیون قرار گرفتند و سپس کدورت محیط کشت با دستگاه اسپکتروفتومتری مورد سنجش قرار گرفت و نمودار رشد آن ترسیم شد[۲۰].

۳-٤-ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه های جداسازی شده

جهت بررسی فعالیت آنتاگونیستی باکتری های جداسازی شده بر روی پاتوژن ها، لاکتوباسیلوس هادر محیطbroth MRS و در شرایط بی‌هوازی کشت و در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت انکوبه شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و مایه رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد. سپس فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های جداشده از باکتری‌ها روی باکتری‌های پاتوژن شاخص*سالمونلاتیفی موریوم*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس*و *اشریشیا کلی*به روش چاهک‌گذاری بررسی شد و قطر هاله های عدم رشد اندازه گیری و ثبت گردید، در این روش باکتری های پاتوژن به روش نیم مک فارلند رقیق سازی شدند و مقدار باکتری ها در حدود $1,5\times10^{8}$ تعیین شد[۲۲].

۳-۵-سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک

حساسیت و مقاومت باکتری های جداسازی شده، نسبت به آنتی بیوتیک های کلرامفنیکل، کلیندامایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین با روش دیسک دیفیوژن مورد بررسی قرار گرفت[۲۳].

٦- شناسایی مولکولی

٦-۱-استخراج DNA و تکثیر ژن 16S rRNA[4]

DNA باکتری توسط کیت DNP (سیناکلون، ایران) با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج شد، کمیت و کیفیت نمونه‌های استخراج شده با استفاده از نانودراپ بررسی شد. سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سویه های لاکتوباسیلوس ناحیه 16S rRNA (تکاپوزیست، ایران) شامل (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') HalF و (5' AAGGTTACCTCACCGACTTC 3') LacR، تکثیر DNA ژنوم باکتری توسط واکنش PCR[5] انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شدند و سپس نمونه‌ها جهت تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. در نهایت توالی‌های به‌دست آمده در سایت NCBI بلاست شدند و ژنوتیپ نمونه‌های مورد بررسی تعیین گردید[٢٤].

۷- یافته ها

۷-۱-جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیلوس های جدا شده

از ٤٠ نمونه لبنیات محلی استان فارس (۱۲شیر خام، ۱۵ ماستو ۱۳ پنیر)، بر اساس نتایج اولیه حاصل از بررسی مورفولوژی کلنی، واکنش گرم و کاتالاز، ٣٦ سویه باکتری باسیلوس گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی شد. براساس نتایج به دست آمده از آزمون های بیوشیمیایی و میکروبی تعداد سویه های جداسازی شده به ۱۰ سویه، ۳ جدایه از شیرخام (M1,M2,M3) و ٤ جدایه از ماست (Y1,Y2,Y3,Y4) و ۳ جدایه از پنیر (C1,C2,C3) کاهش یافت. سویه های جداسازی شده، بی-هوازی، گرم مثبت، کاتالاز منفی، کپسول منفی، تاژک منفی، هیدرولیز ژلاتین منفی، اندول منفی، فاقد تحرک، احیای نیترات منفی، اکسیداز منفی، اسپور منفی و سیمون سیترات منفی بودند. نتایج آزمون‌های میکروبی و بیوشیمیایی و تخمیر قند در جدول ۱ و جدول ۲ نشان داده شده است.

4. 16S ribosomal RNA
5. Polymerase chain reaction

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

Table 1 Results of microbial and biochemical tests of 10 gram-positive and catalase-negative bacilli isolated from 40 samples of traditional dairy products in Fars province

C3	C2	C1	Y4	Y3	Y2	Y1	M3	M2	M1	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Capsule
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Catalase
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Flagella
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gas
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gelatin Hydrolysis
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Gram Staining
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Indole
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Motility
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Nitrate Reduction
B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	Oxidase
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Shape
-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	Spore
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Urease
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Simmon Citrate

Table 2 Results of sugar fermentation tests in 10 gram-positive and catalase-negative bacilli isolated from 40 traditional dairy samples in Fars province

C3	C2	C1	Y4	Y3	Y2	Y1	M3	M2	M1	
v	+	+	+	+	-	v	+	+	v	Arabinose
+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	Inositol
+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	Trehalose
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	Raffinose
+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	Rhamnose
-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	Ribose
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Xylose
-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	Sucrose
-	+	+	+	v	-	v	+	+	v	Cellobiose
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Fructose
+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	Galactose
+	+	+	+	-	+	v	+	+	v	Glucose
-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	Lactose
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Mannose
+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	Mannitol
-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	Melibiose
-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	Melositosis
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	Salicin

۷-۲-بررسی پتاسیل پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس های جداسازی شده

۷-۲-۱-مقاومت به pH

پس از بررسی تست‌های بیوشیمیایی ۵ جدایه (M2,M3,Y2,Y4,C1) با خصوصیاتی نزدیک به *لاکتوباسیلوس* ها شناسایی شدند، سپس از نظر مقاومت به pH های مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها در pH بین ۲ تا ۵ رشد خوبی داشته و بهینه رشد در pH 5 بود. همچنین سویه‌های جداشده توانایی رشد در pHقلیایی را داشتند. با توجه نتایج آزمایشات سویه M3 و Y4 نسبت به بقیه دارای تحمل بالایی نسبت به طیف وسیعی از pH بود (شکل ۱). مقاومت به

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

pHهای مختلف یکی از خواص مهم پروبیوتیک‌ها است. بنابراین سویه انتخاب شده به دلیل تحمل pHهای اسیدی و قلیایی می‌توانند به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شوند.

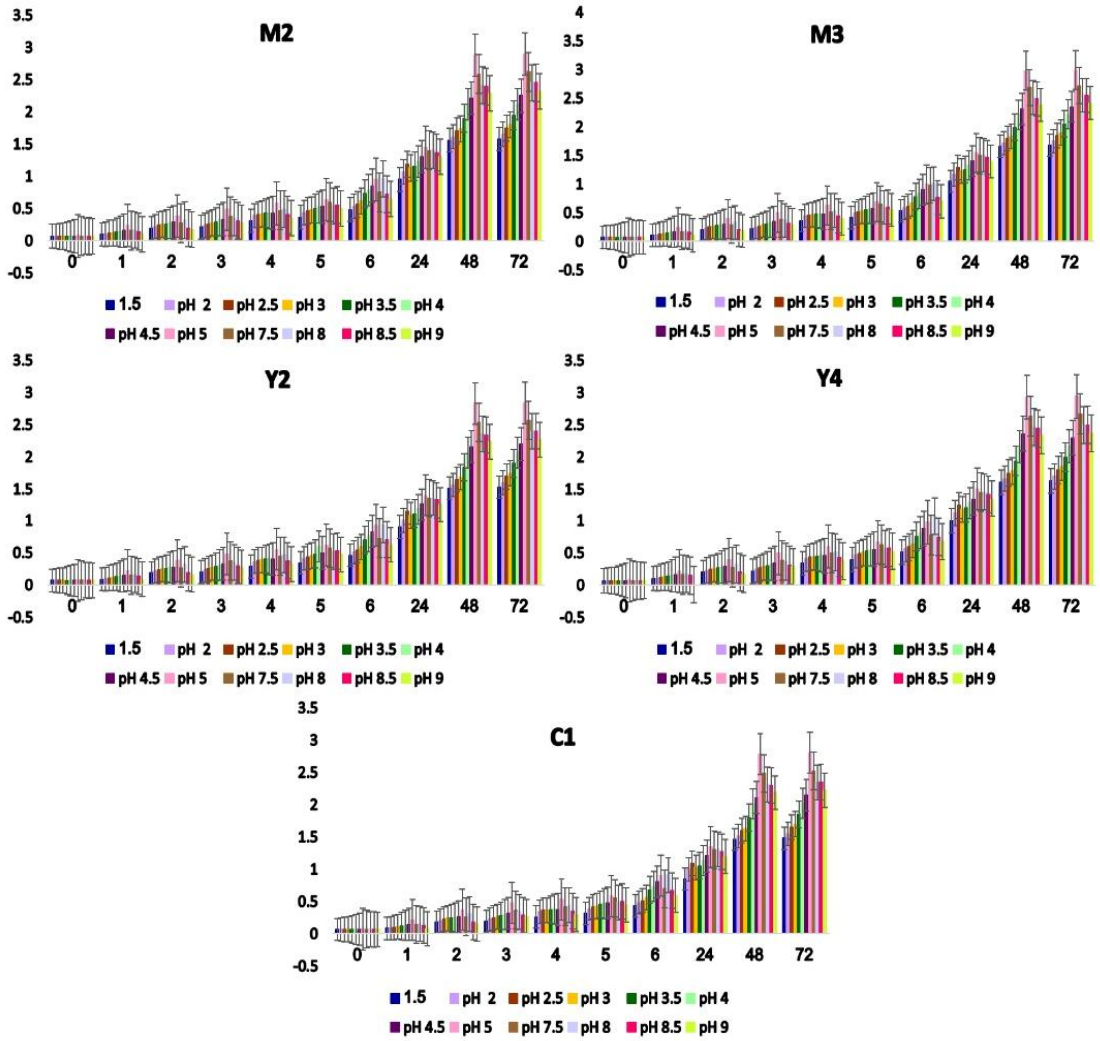

Fig 1 Growth chart of bacteria M2, M3, Y2, Y4 C1, at pH 1 to 9

۷-۲-۲-مقاومت به نمک صفراوی

۵ جدایه (M2,M3,Y2,Y4,C1) دارای خصوصیات مشابه لاکتوباسیلوس ها، از نظر مقاومت به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. این جدایه‌ها مقاومت خوبی نسبت به غلظت‌های مختلف Ox-gall را نشان دادند. بهترین نتیجه در جدایه M3 و Y4 مشاهده شد (شکل ۲). مقاومت به غلظت‌های مختلف نمک صفراوی نیز یکی دیگر از خواص مهم پروبیوتیک‌ها می باشد. در نتیجه سویه انتخاب شده به دلیل تحمل زیاد نسبت به نمک‌های صفراوی این قابلیت را دارد که به عنوان پروبیوتیک در نظر گرفته شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

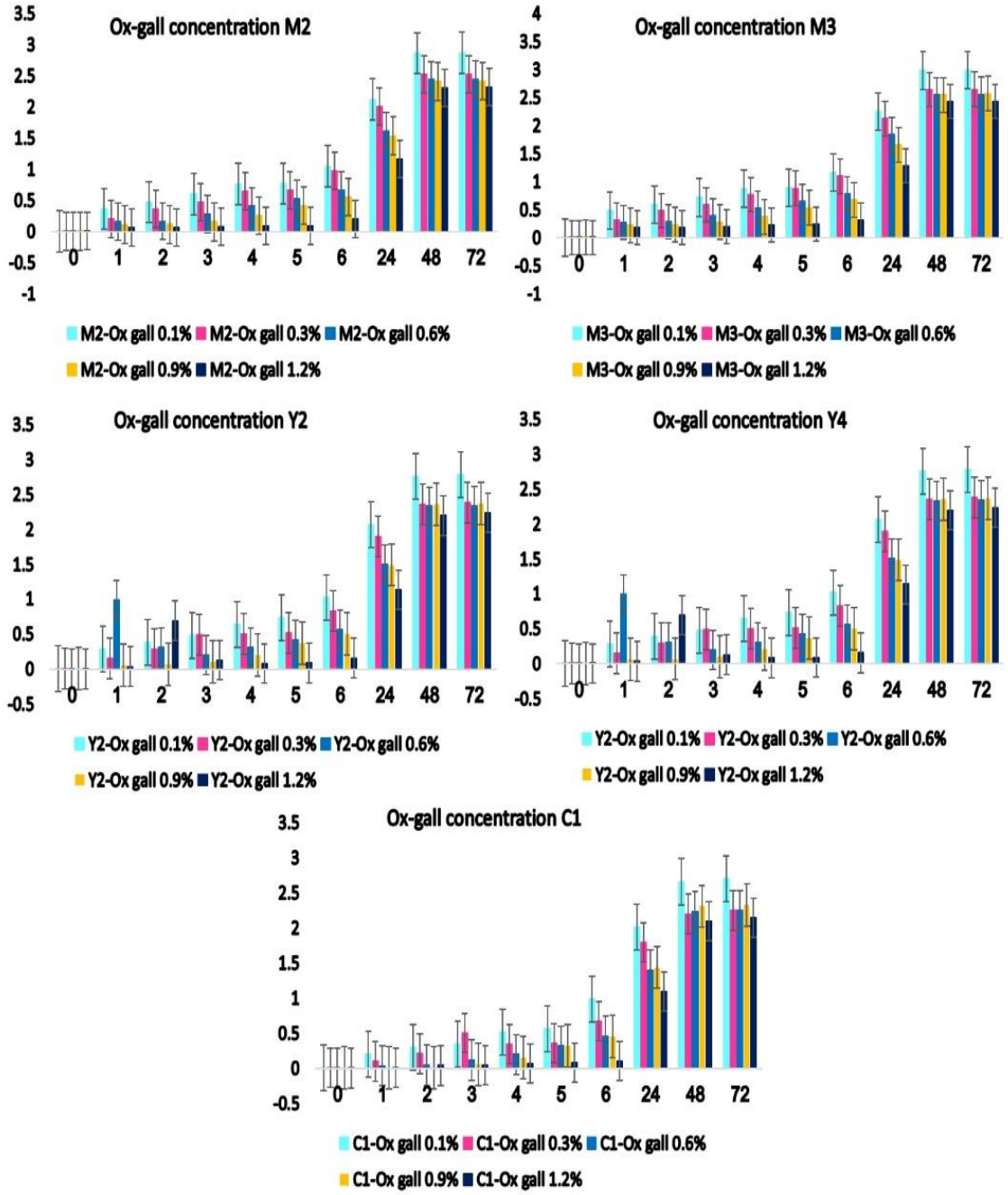

Fig 2 Growth chart of bacteria M2, M3, Y2, C1, Y4 in different dilutions of bile salt

۷-۲-۳-تحمل غلظت‌های مختلف نمک NaCl

غلظت‌های مختلف نمک NaCl در ۵ جدایه منتخب مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه‌های انتخابی رشد خوبی در غلظت‌های مختلف نمک داشته و بهترین نتیجه مربوط به سویه M3 و Y4 بود (شکل ۳). رشد در غلظت‌های بالای نمک NaCl از خصوصیات پروبیوتیکی محسوب می شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

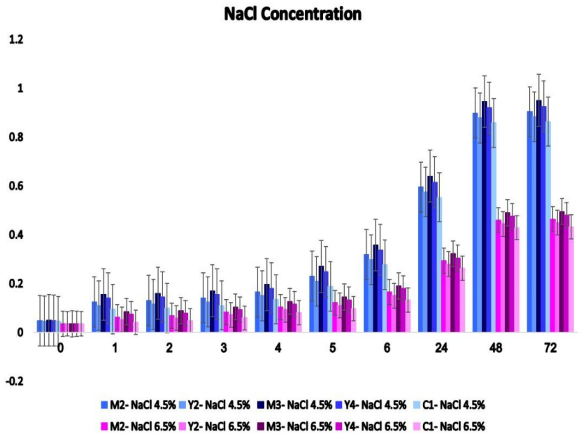

Fig 3 Growth chart of M2, Y2, M3, Y4 and C1 bacteria in dilution of 4.5 and 6.5% NaCl salt

۷-۲-٤-ارزیابی فعالیت ضد میکروبی و سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک

اثر فعالیت‌های ضد باکتریاییجدایه های*لاکتوباسیلوس* های انتخابی با روش چاهک‌گذاری در برابر پاتوزن های *سالمونلاتیفی موریوم*، *سودوموناس ائروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*و *اشریشیا کلی* بررسی شد. نتایج مربوط به قطر هاله های عدم رشد در سویه های مختلف، متفاوت و بین۷ تا ۱۵ میلی متر بود. جدایه ها بر روی پاتوژن ها فعالیت ضد باکتریای داشته و همچنین سویه های M3 و Y4دارای بیشترین اثر ضد میکروبی بودند. نتایج بدست آمده در جدول ۳ نشان داده شده است.

Table 3 Antibacterial activities of selected *lactobacilli* against various pathogens

	S.typhimurium	*P.aeruginosa*	*S. aureus*	*E.coli*
M2	10 mm*	11 mm	9 mm	8 mm
M3	9 mm	10 mm	13mm	10 mm
Y2	7 mm	8 mm	9 mm	7 mm
Y4	9 mm	15 mm	12 mm	9 mm
C1	8 mm	9 mm	10 mm	7 mm

*millimeter

جدایه های مورد بررسی در برابر تعدادی از آنتی بیوتیکها شامل از لحاظ حساسیت و مقاومت مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج این بررسی در جدول ٤ نشان داده شده است.

Table 4 The results test of resistance of isolated *lactobacilli* to common microbial antibiotics

	Chloramphenicol	Erythromycin	Ampicillin	Clindamycin	Tetracycline
M2	R*	R	R	S	S
M3	S**	R	R	R	R
Y2	R	S	R	S	S
Y4	S	R	R	R	R
C1	S	S	S	R	S

* Resistant ** Sensitive

۸- شناسایی مولکولی

با توجه به نتایج حاصله از این مطالعه، مشخص شد که دو سویه دارای خصوصیات پروبیوتیکی بهتری بودند؛ در نتیجه این دو سویه جهت توالی یابی ژنوم 16S rRNA ارسال شدند و سپس نتایج در سایت NCBI بلاست و درخت فیلوژنتیکی برای آنها رسم شد. (شکل٤) نتایج توالی یابی نشان داد که سویه M3دارای شباهت ۱۰۰ در صدی با سویه *Lactobacillus brevis*strain T118 است و سویهY4دارای تشابه ۹۹,۸۹درصدی با *Lactobacillus casei* strain 1SA1 می باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

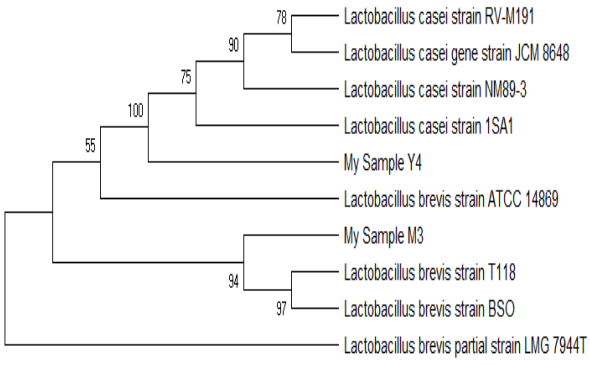

Fig 4 Phylogenetic tree for strains M3 and Y4

۹- بحث

امروزه از مواد و روشهای طبیعی مختلف برای پیشگیری یا درمان بیماریها استفاده میشود. استفاده از پروبیوتیکها یکی از این روشها است. لاکتوباسیلها و بیفیدوباکتریوم ها فلور طبیعی روده هستند که با جلوگیری از عفونت روده، کاهش کلسترول، تحریک سیستم ایمنی بدن و کاهش خطر سرطان روده بزرگ نقش مهمی در سلامت انسان ایفا میکنند[۲۵]. باکتریهای پروبیوتیک، اسیدلاکتیک و اسیدهای آلی تولید میکنند، pH محیط را کاهش میدهند و سعی میکنند از رشد بسیاری از باکتریها جلوگیری کنند. این باکتریها ترکیبات ضدمیکروبی مانند باکتریوسین تولید میکنند که میتوانند به عنوان نگهدارنده طبیعی استفاده شوند[۲۶]. سالهاست که محصولات لبنی به عنوان محصولات ارزشمند برای سلامت انسان شناخته میشوند [۲۵]. در سالهای اخیر، بسیاری از دانشمندان باکتری های اسید لاکتیک و لاکتوباسیلها را از محصولات سنتی در سراسرجهان جدا و شناسایی کرده و اثرات آنتاگونیستی آنها را در برابر عوامل بیماریزای مختلف ارزیابی کرده اند[۲۷]. میکروارگانیسمهایی مانند لاکتوباسیلها و بسیاری از باکتریهای دیگر میتوانند عوامل بیماریزا را از طریق مکانیسمهای متعدد از جمله حذف رقابتی که منجر به ایمنی غذا میشود، از بین ببرند[۲۵]. عرضه‌ی محصولات با باکتری‌های زنده پروبیوتیک که به هضم غذا و سلامتی کمک می‌کنند، میزان پذیرش محصولات لبنی را افزایش می‌دهد.با توجه به این امر، صنایع غذایی تقاضای زیادی برای باکتری‌های جدید نامزد پروبیوتیک، شیرهای تخمیر شده و سایر محصولات لبنی دارند [۲۸]. هدف از این پژوهشناسایی و جداسازی باکتری های لاکتوباسیلوس دارای ویژگی‌های بالقوه پروبیوتیک بومی ایران از لبنیات سنتی استان فارس و ارزیابیآنها به منظور کشف پتانسیل‌های تولید مواد افزودنی برای صنایع لبنی بود.

pH شیره معده به عنوان معیار مهمی برای عملکرد پروبیوتیک ها در نظرگرفته میشود[۲۹]. قدرت بقاء لاکتوباسیلوسها در pH های اسیدی و حضور نمک صفراوی بسیار مهم می باشد چرا که مصرف خوراکی پروبیوتیک ها، میکروارگانیسم را با طیفی از استرسهای دستگاه گوارش که در معده شدت می گیرند، روبرو می کند در نتیجه مقاومت به اسید معده و نمک صفراوی، عبور موفقیت آمیزپروبیوتیک از معده و استقرار آن در روده را تضمین می کند [۱۶]. در این مطالعه ۵ جدایه غربال شده توسط آزمایش مقاومت در برابر اسید و نمک صفراوی مورد بررسی قرار گرفتند و سویه ها نتایج متفاوتی داشتند ولی دو سویه M3 وY4 نسبت به سایر سویه ها رشد و مقاومت بهتری را در این شرایط از خود نشان دادند. ممکن است سطوح مختلف مقاومت به نمک صفراوی و شرایط اسیدی بستگی به بیان پروتئین‌هایخاص باکتریایی [۳۰] و مرتبط با مقاومت صفرا در باکتری‌های اسید لاکتیک داشته باشد[۳۱]. NaCl یک ماده بازدارنده است که ممکن است مانع رشد برخی از انواع باکتریها شود و پروبیوتیک ها باید غلظت بالای نمک را در روده انسان تحمل کنند[۳۲]. در این مطالعه سویه ها از لحاظ مقاومت به مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج خوبی را نشان دادند. باکتریهای اسیدلاکتیک میتوانند ترکیبات آنتاگونیستی تولید کنند که دارای طیف فعالیتی متفاوتی هستند[۳۳]. داشتن خواص ضد میکروبی از ویژگی های مهم پروبیوتیک هاست که در مطالعات گذشته، بوریس و همکاران. نشان دادند که سویه های لاکتوباسیل جدا شده از محصولات لبنی قادر به جلوگیری از رشد *سالمونلاتیفی موریوم*، *سودوموناس ائروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس*و *اشریشیا کلی*هستند[۳۴]. در مطالعه انجام شده نیز تاثیر سویه های جدا شده بر روی این پاتوژن ها بررسی و نتایج مشابهی مشاهده شد و دو سویه M3 و Y4تاثیز مهاری بهتری از خود نشان دادند. این توانایی ممکن است به دلیل تولید باکتریوسین‌ها و مکانیزم‌هایی از جمله تولید ترکیبات بازدارنده باکتریایی، انسداد

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

محل‌های اتصال باکتری‌های پاتوژن، رقابت پروبیوتیک‌ها با باکتری‌های پاتوژن برای جذب مواد مغذی، تولید اسیدهای آلی مانند اسید پروپیونیک، اسید لاکتیکفنیلیا اسیدهای چرب آزاد توسط پروبیوتیک‌ها باشد [۳۵, ۳۶]. میکروارگانیسمهای پروبیوتیک باید ایمن باشند، یعنی باکتریهای پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلها، اساساً ناتوان از ایجاد همولیز و همچنین مایع شدن ژلاتین در بدن میزبان هستند. حساسیت آنتی بیوتیکی و همچنین ویژگی ذاتی مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوباسیلها به تولید محصولات بی خطر پروبیوتیک برای مصرف انسان کمک میکند[۳۷]. نتایج مطالعه انجام شده نشان دهنده مقاومت و حساسیت جدایه ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، کلیندامایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین است. حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سایر مطالعات دیگر نیز برای باکتری های پروبیوتیک گزارش شده است[۳۸]. برای به دست آوردن شناسایی دقیق و قابل اطمینان از گونه های پروبیوتیک، باید از تکنیکهای مولکولی استفاده کرد[۳۹] در این مطالعه نیز، علاوه بر استفاده از روش‌های میکروبی و بیوشیمیایی جهت جداسازی و شناسایی سویه ها، از روش مولکولی و توالی‌یابی ژن16S rRNAبرای شناسایی دقیق‌تر سویه ها نیز استفاده شد و نتایج نشان داد که جدایه M3 دارای ۱۰۰٪ شباهت به لاکتوباسیلوس برویسو جدایه Y4 دارای ۱۰۰٪ شباهت لاکتوباسیلوس کازئی بود.

۱۰- نتیجه گیری

بر اساس تحقیق انجام شده و نتایج حاصل از بررسی خواص پروبیوتیکی می توانیم دو باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* جداشده از لبنیات سنتی استان فارس را به عنوان باکتری های پروبیوتیک در نظر گرفته و آنها را در صنایع غذایی مختلف از جمله لبنیات و همچنین جهت ارتقا کیفیت غذای دام و طیور مورد استفاده و بهره برداری قرار دهیم.

۱۱- فهرست واژگان لاتین

LAC: Lactic acid bacteria
MRS: De Man, Rogosa and Shrpe
SIM: Sulfide-Indole-Motility
16S Rrna: 16S ribosomal RNA
PCR: Polymerase chain reaction

۱۲- منابع

[1] Minj J, Paul C, Sharma R K. 2020.Bio-functional properties of probiotic Lactobacillus: current applications and research perspectives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition.61(13):2207-24.
[2] Bazireh H, Azimzadeh Jamalkandi S, Ahmadiand A, Boroumand M A. 2020. Isolation of Novel Probiotic Lactobacillus and Enterococcus Strains From Human Salivary and Fecal Sources. Frontiers in Microbiology.11:597946.
[3] Besser M, Weber L, Ghebremedhin B, Naumova E A, Arnold W H, et al. 2019. Impact of probiotics on pathogen survival in an innovative human plasma biofilm model (hpBIOM). J Transl Med.17:243.
[4] Reuben R C, Sarkar S L, Rubayet Ul Alam A S M, Jahid I K.2020. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. J Dairy Sci.103(2):1223-37.
[5] Edalati E, Alizadeh M, Hosseini SS, Bialvaei AZ, Taheri K. 2019.Isolation of probiotic bacteria from raw camel's milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. New Microbes New Infect.27:64-8.
[6] Khedid K, Mokhtari A, Soulaymani A, Zinedine A. 2009.Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. Microbiol Res.164:81-91.
[7] Dahroud BD, Khiabani MS, Hamishehkar H, Bialvaei AZ, Yousefi M, et al..2016. Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of Lactobacillus casei subsp. casei ATTC 39392. Int J Biol Macromol.86:462-7.
[8]Ogier J C.2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. Int J Food Microbiol.126(3):291-301.
[9] Neuzil Bunesova V, Modrackova N, Vlkova E, Bolechova P, Burtscher J, et al. 2021.Five novel bifidobacterial species isolated from faeces of primates in two Czech zoos: Bifidobacterium erythrocebi sp. nov., Bifidobacterium moraviense sp. nov., Bifidobacterium oedipodis sp. nov., Bifidobacterium olomucense sp. nov. and Bifidobacterium panos sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol.71(1):004573.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

[10] Soccol RC, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, De Dea Lindner L, et al. 2010.The Potential of Probiotics. Food Technol Biotech.48(4):413-34.

[11] Santacroce L, Bottalico L.2019. A successful history: Probiotics and their potential as antimicrobials. Expert Rev Anti Infect Ther.17(8):635-45.

[12] Mohammed M, Omran N, Anwar S., Awad S. El-Soda, M.2009. SRep-PCR Characterization and Biochemical Selection of Lactic Acid Bacteria Isolated from the Delta Area Egypt. Int J Food Microbiol.128(3):417-23.

[13] Partovi R, Akhondzadeh Basti A, Noori N, Nikbakht Borujeni G, Kargozari M. 2015.Microbiological and Chemical Properties of S iahmazgi Cheese, an I ranian Artisanal Cheese: Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria. J Food Process Pres.39(6):871-80.

[14]Parsaeimehr M, Jebellijavan A, Staji H. 2019.The Isolation and Identification of Dominant Lactic Acid Bacteria by the Sequencing of the 16S rRNA in Traditional Cheese (Khiki) in Semnan, Iran. J Hum Environ Health Promot.5(1):15-20.

[15] N. D. 2012. The influence of transglutaminasetreatment on functional properties of strained youghrt. J Anim Vet Adv.11(13):2238-46.

[16] Rokhtabnak N, Sasan H A.2016. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. Iran J Med Microbiol.10(1):24-34.

[17] Narimani T, Tarinejad A,Hejazi M A. 2015.Isolation and biochemical and molecular identification of probiotic bacteria from traditional buffalo milk and yogurt of Khoi city.Iranian Journal ot Food Science and Technology.12(48):115-28.

[18] Yan S, Liu X, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2017. Production of exopolysaccharide by Bifidobacterium longum isolated from elderly and infant feces and analysis of priming glycosyltransferase genes. RSC advances.7(50):31736-44.

[19] Hussain SM, Ahmed LA, Udipi M, Sukumaran SK. 2020. Bioprocess development for enhanced production of probiotic Bifidobacterium bifidum. Current Science.118(2):280.

[20] Nath S, Roy M, Deb B. 2020.In vitro screening of probiotic properties of Lactobacillus plantarum isolated from fermented milk product. Food Quality and Safety.4(4):213-23.

[21] Noohi N, Rohani M, Talebi M, Pourshafie MR. 2021.Screening for probiotic characters in lactobacilli isolated from chickens revealed the intra-species diversity of Lactobacillus brevis. Animal Nutrition.7(1):119-26.

[22] Karakas Sen A.2018. Isolation, identification and technological properties of lactic acid bacteria from raw cow milk. Agricultural Sciences.34(2):385-99.

[23] Erdourul O. 2006.Isolation and Characterization of Lactobacillus bulgaricus andLactobacillus casei from Various Foods. Turk J Biol.30:39-44.

[24] Nomoto R, Tanaka K, Tsujikawa Y, Kusunoki H, Osawa R.2017. Isolation and identification of Bifidobacterium species from feces of captive chimpanzees. Bioscience of microbiota, food and health.36(3):91-9.

[25] Karami S, Hamzavi H, Bahmani M , Hassanzad azar H , Mahmoodnia L, Rafieian Kopaei M. 2017.Isolation and identification of probiotic Lactobacillus from local dairy and evaluating their antagonistic effect on pathogens. Int J Pharm Investig.7(3):137-41.

[26] Aroutcheva AA, Faro S.2001. Antimicrobial protein produced by vaginal Lactobacillus acidophilus that inhibits Gardnerella vaginalis. Infect Dis Obstet Gynecol.33-9.

[27] Rossetti L, Gatti M, Lazzi C, Neviani E, Giraffa G. 2008. Grana Padano cheese whey starters: Microbial composition and strain distribution. Int J Food Microbiol.127:168-71.

[28] Colombo M, Eller M, Nero LA. 2018.The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. Journal of Dairy Research.85(4):487-96.

[29] Mantzourani I, Bontsidis Ch, Karolidou K,Terpou A, Alexopoulos A, Bezirtzoglou E, Galanis A, Plessas S.2019. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro experimental systems. Annals of Microbiology volume.69:751-63.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]

[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

[30] Yu Z1, Li S, Li C, Li D, Yang Z. 2013.Evaluation of probiotic properties of Lactobacillus plantarum strains isolated from Chinese sauerkraut. World Journal of Microbiology & Biotechnology.29(3):489-98.

[31] Hamon E, et al. 2011.Comparative proteomic analysis of Lactobacillus plantarum for the identification of key proteins in bile tolerance. BMC microbiology.11(1):1-11.

[32] Prabhurajeshwar Ch. 2017.Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. Biomed J.40(5):270-83.

[33] Ahmed Rushdy A. 2013.Antimicrobial compounds produced by probiotic Lactobacillus brevis isolated from dairy products. Ann Microbiol.63:81-90.

[34] Boris S, Caso JL, Barbes C. 2001.Partial characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis UO004, an intestinal isolate with probiotic potential. J Appl Microbiol.91:328-33.

[35] Prabhurajeshwar C. 2019.Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic Lactobacilli strains isolated from commercial yoghurt. Clinical Nutrition Experimental. Clinical Nutrition Experimental.23(97-115).

[36] Barbosa AAT, Jain S. 2017.Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products. Critical reviews in biotechnology.37(7):852-64.

[37] Halder D, Sekhar Chatterjee Sh, Kumar Pal N, Mandal Sh. 2017.Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. Biomedicines.5(2):31.

[38] Sharma Ch, Thakur N,Pal Singh B, Gupta S, Kaur S, Kumar Mishra S, Kumar Puniya A, Pal Singh Gill J, Panwar H. 2017.Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. 3 Biotech.7(1):53.

[39] Farahmand N, Naghizadeh Raeisi Sh, Sutherland J, B. Ghoddusi H. 2021.Probiotic Lactobacilli in Fermented Dairy Products: Selective Detection, Enumeration and Identification Scheme. Microorganisms. 9(8):1600.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Isolation and Biochemical and Molecular Identification of Lactobacilli from Traditional Dairy in Fars Province and Investigation of Their Probiotic Potential

Zamani, N. [1], Akhavan Sepahi, A. [2*], Fazeli, M. R. [3], Shariatmadari, F. [4]

1. Ph.D. candidate, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Drug and Food Control, School of Pharmacy, Drug Quality Assurance Research Center, Research Institute of Pharmaceutical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Professor, Department of Animal Sciences, School of Agriculture., Tarbiat modares University, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Lactobacilli are the most well-known strains with probiotic properties that have a great effect on promoting gastrointestinal health.The purpose of this study was to isolate and evaluate the probiotic properties of local Lactobacillus in dairy products in Fars province. Gram-positive and catalase-negative bacilli were isolated and analyzed from dairy samples by chemical methods.To evaluate the probiotic properties of the isolates, their growth rate was measured at different acidic and alkaline pHs, different concentrations of bile salt and NaCl salt.The antimicrobial activity of the isolates on pathogenic bacteria was investigated by agar well diffusion method and also susceptibility testing to common antibiotics was performed by disk diffusion method.Optimal strains were identified molecularly by 16 S rRNA gene sequencing.Out of 36 gram-positive and catalase-negative strains, 10 strains were biochemically similar to Lactobacilli that 5 strains being able to grow at pH 3 to 9 and different concentrations of bile salt and NaCl salt.These bacteria had antimicrobial activity against common pathogens and were resistant to the antibiotics Clindamycin, Ampicillin, Erythromycin, and Tetracycline.Strains M3 and Y4 had better probiotic properties.Molecular evaluation showed that these two strains are 100% and 99.98% similar to Lactobacillus brevis and Lactobacillus casei strains, respectively.As a result, it was found that these two strains of Lactobacillus with approved probiotic properties are available in traditional dairy products in Fars province, which can be used in the dairy food industry to improve the quality of livestock and poultry feed.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2021/ 09/ 12
Accepted 2021/ 12/ 06

Keywords:

Probiotic,
Lactobacillus,
Isolation,
16S rRNA.

DOI: 10.52547/fsct.19.123.41

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5

*Corresponding Author E-Mail:
akhavansepahy@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-07-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.123.10.5]
[DOI: 10.52547/fsct.19.123.41]