مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

جداسازی و شناسایی سویه *Limosilactobacillus fermentum* ARD2 از ماست محلی و ارزیابی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی آن

بهروز علیزاده بهبهانی[۱*]، محمدامین مهرنیا[۱]، حسین جوینده[۲]، فاطمه مطوری[۳]

۱- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۲- استاد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

۳-دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/٤/۱۷

کلمات کلیدی:

فعالیت آنتی‌اکسیدانی،

فعالیت همولیتیک،

آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی،

سوپرناتانت فاقد سلول.

DOI:10.22034/FSCT.21.154.184.

* مسئول مکاتبات:

B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

چکیده

نقش مهم و اساسی غذا در زندگی، سبب روی آوردن به سمت محصولاتی شده است که علاوه بر دارا بودن خواص کیفی و تغذیه‌ای مطلوب، سلامت کلی مصرف‌کننده را نیز تضمین می‌کنند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زایی هستند که در صورت مصرف مقادیر کافی سبب برقراری تعادل میکروبی روده شده و سلامتی و ایمنی بدن را افزایش می‌دهند. در این پژوهش، ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدباکتریایی و ایمنی سویه Limosilactobacillus fermentum ARD2 جدا شده از ماست محلی بررسی شد. مقاومت به اسید (۲، ۳ و pH=٤)، مقاومت به نمک‌های صفراوی (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد)، فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک و چاهک، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هیدروفوبیستی سطح سلول، آنزیم DNase، فعالیت همولیتیک و آمین بیوژنیک و جذب کلسترول بررسی گردید. نتایج مقاومت به اسید نشان داد که تعداد سلول‌های زنده سویه L. fermentum ARD2 با افزایش pH از ۲ به ٤، افزایش یافته و با افزایش زمان از صفر به ۳ ساعت در pH ثابت روند کاهشی مشاهده گردید. با افزایش غلظت نمک‌های صفراوی، رشد کاهش یافت. نتایج حاصل از اثر ضدمیکروبی نشان داد که در هر دو روش چاهک و دیسک سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول (aCFS) و سوپرناتانت خنثی شده فاقد سلول (nCFS) روی Escherichia coli اثر ضد میکروبی نداشتند. nCFS فاقد اثر ضدمیکروبی بر Shigella dysenteriae بود. L. fermentum ARD2 به Ciprofloxacin مقاوم و نسبت به Penicillin و Nitrofurazone نیمه حساس بود. میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب معادل ٤۱/٤۰ و ٤۳/٦۰ درصد بوده و این سویه توانست جذب کلسترول را به میزان ۳۸/٦۰ درصد کاهش دهد. نتیجه تست‌های DNase و فعالیت همولیتیکی منفی بود و تولید آمین بیوژنیک مشاهده نگردید. مطابق با نتایج به دست آمده L. fermentum ARD2 قابلیت پروبیوتیکی قابل قبولی داشته و می‌توان از این سویه در محصولات غذایی به عنوان یک باکتری پروبیوتیک استفاده نمود.

۱-مقدمه

غذا نقش مهم و اساسی در بهبود سلامتی دارد و با مصرف صحیح مواد غذایی می‌توان از ابتلا به انواع بیماری‌ها پیشگیری نمود. بر همین مبنا، تغییر سبک زندگی، افزایش آگاهی مردم و تمایل آن‌ها به داشتن سبک زندگی سالم، منجر به روی آوردن به سمت غذاهایی شده که علاوه بر دارا بودن خواص کیفی و تغذیه‌ای مطلوب، خواصی داشته باشند که سلامتی انسان را تضمین کنند و منجر به کاهش هزینه‌های درمانی سنگین ناشی از بروز بیماری‌ها شوند [۱]. پروبیوتیک از کلمه "پرولایف" به معنای "برای زندگی" مشتق شده است. سازمان بهداشت جهانی، تعریف کلی برای این واژه مطرح نمودند که طبق آن، پروبیوتیک‌ها را به عنوان میکروارگانیسم‌های زنده و غیربیماری‌زایی معرفی کرده‌اند که در صورت مصرف در مقادیر کافی و مشخص (Colony Forming Unit/mL 10^7)، آثار مطلوبی بر سلامت میزبان خواهد داشت. در گذشته، از پروبیوتیک‌ها به عنوان مواد ترشح شده از یک میکروارگانیسم که محرک میکروارگانیسم‌های دیگر است، نام برده می‌شد [۲] و به نوعی از میکروبیوتای بومی میزبان جدا شده بودند اما امروزه به میکروبیوتای میزبان تعلق نداشته و از سایر منابع همچون غذاهای تخمیر شده و میوه استخراج می‌شوند [۳].

مقاومت نسبت به اسید معده، آنزیم‌های گوارشی و مراحل فرآوری و تولید، نمک‌های صفراوی، غیربیماری‌زا و غیرتهاجمی بودن، توانایی حفظ و پایداری ژنتیکی، قابلیت اتصال به سلول‌های اپی‌تلیال روده و توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا از ویژگی‌های متعدد پروبیوتیک‌های ایده‌آل می‌باشند. همچنین سبب کاهش خطر ابتلا به اسهال در کودکان (ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها) شده و از نوزادان و شیرخواران در برابر بیماری‌هایی همانند التهاب، نکروز روده‌ای و سپسیس محافظت می‌کنند و گاهی با مصرف میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک از بروز برخی بیماری‌های تنفسی مثل سرماخوردگی جلوگیری می‌شود [٤]. علاوه بر موارد گفته شده، بهبود و افزایش قابلیت هضم شیر در افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز[1]، تنظیم سیستم ایمنی بدن، تولید ویتامین‌های گروه B، تولید پپتیدهای ضد میکروبی، افزایش ایمنی بدن و جلوگیری از سرطانی شدن سلول‌ها اثرات استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشند [۱].

میکروارگانیسم‌هایی که عمدتاً به عنوان پروبیوتیک مطرح هستند به خانواده باکتری‌های اسیدلاکتیک و جنس *Bifidobacterium* تعلق دارند، به علاوه جنس‌های *Sterptococcus*، *Lactococcus*، *Lactobacillus* و مخمرهایی نظیر *Saccharomyces cerevisiae* و *Saccharomyces boulardii* از میکروارگانیسم‌های دیگری می‌باشند که کمتر به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌گردند[۱]. باکتری‌های اسید لاکتیک رایج‌ترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشند که در دسته میکروارگانیسم‌های ایمن قرار گرفته و یکی از اعضای مطلوب و مهم میکروبیوتای دستگاه گوارش هستند [۳]. *Lactobacillus*ها یکی از انواع باکتری‌های اسید لاکتیک بوده که گرم مثبت، غیراسپورزا، کاتالاز منفی بوده و معمولاً غیرمتحرک می‌باشند. بیشتر به شکل میله‌ای دیده شده اما اشکال دیگری مانند کوکوباسیل، کربنه و رشته‌ای نیز در آن‌ها مشاهده شده است. دمای بهینه رشد این جنس ۳۰-٤۰ درجه سانتی‌گراد بوده و دارای درصد کمی از بازهای آلی گوانین و سیتوزین می‌باشد. عموماً در غذاهای تخمیری سنتی و نیز دستگاه گوارش یافت شده و بیشترین فلور میکروبی روده باریک را تشکیل می‌دهند از جمله این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به *Lacticaseibacillus casei*، *Limosilactobacillus fermentum*، *Levilactobacillus brevis*،

[1] Lactose intolerance

Lactiplantibacillus plantarum و *Lactiplantibacillus pentosus* و ... اشاره کرد [۲].

همانطور که گفته شد، باکتری‌های اسید لاکتیک یکی از مهم‌ترین گروه‌های باکتریایی هستند که از آن‌ها برای تولید و فرآوری انواع محصولات لبنی، گوشتی، سبزیجات و غلات استفاده می‌گردد. دارای توانایی متابولیزه کردن مواد سازنده ماتریس غذا و تولید ترکیباتی همچون اسید آلی، آلدئید، الکل‌ها، استرها، پپتیدها، اسیدهای آمینه و اسیدهای چرب می‌باشند که ترکیبات به دست آمده، نقش مهمی در تعیین عطر، طعم، بافت و ماندگاری محصولات غذایی تخمیر شده دارد. افزون بر این، اغلب از این باکتری‌ها به عنوان کشت آغازگر طی فرآیندهای تولید مواد غذایی استفاده می‌گردد. به طور کلی، پتانسیل تکنولوژیکی باکتری‌های اسید لاکتیک ویژگی‌هایی را شامل می‌شود که برای حیات و تولید ترکیبات ضروری ایجاد کننده آروما و متابولیت‌های میکروبی نقش دارند. از ویژگی‌های مهم تکنولوژیکی این دسته از باکتری‌ها، می‌توان اتولیتیک، پروتئولیز، لیپولیز و تجزیه سیترات را نام برد [۵].

امروزه به دلیل استفاده روزافزون از مواد لبنی صنعتی، امکان کاهش یا حذف باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارد، همچنین مواد غذایی که روزانه مصرف می‌شوند حاوی مقادیر متفاوتی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در این میان ممکن است سهم پروبیوتیک‌ها ناچیز باشد. بنابراین با توجه به اهمیت پروبیوتیک‌ها و ارتباط آن‌ها با حفظ و افزایش سلامت افراد، جداسازی و شناسایی آن‌ها در محصولات لبنی سنتی و به‌کارگیری جهت تولید انبوه فرآورده‌های لبنی امری ضروری است [٤]. بر همین اساس در پژوهش حاضر به بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی سویه *L. fermentum* ARD2 جدا شده از ماست محلی پرداخته می‌شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- جداسازی و شناسایی سویه *L. fermentum* ARD2

مطابق با مطالعه سبکتکین و همکاران (۲۰۲۱)، جداسازی و شناسایی سویه انجام پذیرفت. جمع‌آوری نمونه‌ها به طور تصادفی از بازار محلی (تشان، بهبهان، خوزستان، ایران) انجام شد و پس از آن تحت شرایط یخچالی به آزمایشگاه منتقل شدند. در مرحله نخست، ۵ گرم نمونه به آب پپتونه (۰/۱ درصد، ٤٥ میلی‌لیتر) افزوده و نمونه‌ها همگن شدند (Seaward، آلمان). از رقت‌های تهیه شده ($۱۰^{-۶}$-$۱۰^{-۱}$-۱۰) بر محیط MRS آگار کشت داده شد. سپس سویه جدا شده از محیط کشت، در معرض رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز قرار گرفت. با استفاده از کیت‌های استخراج Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران) استخراج DNA انجام شد و در محیط کشت MRS براث به مدت یک شب کشت داده شده و پس از ایجاد رسوب در میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون میکروبی و حل نمودن در ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و افزودن محلول آنزیمی مناسب برای رسیدن به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، همانند پروتکل شرکت سازنده، عمل شد. پرایمرهای Universal که بر اساس نواحی حفظ شده ژن ١٦S rRNA طراحی شده‌اند، مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR در کیت PCR در حجم نهایی ۲۵/۱۵ میکرولیتر انجام پذیرفت و میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش‌دهنده‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. نتایج نشان داد که ایزوله با خواص کاتالاز منفی و گرم مثبت با میزان شباهت ۹۸ درصد متعلق به سویه *L. fermentum* ARD2 است [٦].

۲-۲- ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه *L. fermentum* ARD2

۲-۲-۱- آزمون مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی

آزمون مقاومت به اسید مطابق با روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، انجام شد. برای بررسی مقاومت به اسید، در ابتدا سویه مورد نظر در ۵ میلی‌لیتر محیط MRS براث به مدت

۲٤-۱۸ ساعت تلقیح شده و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سلول‌های باکتری رشد یافته با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰g، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد از محیط کشت جدا شدند. سپس ۲ بار پلیت‌ها شستشو داده شده و مجدد در محلول بافر فسفات استریل(PBS) (سیگما-آلدریچ) معلق شدند. پس از آن، pH محلول بر ۲، ۳ و ٤ تنظیم و به مدت صفر، ۱، ۲ و ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. سرانجام، با روش رقت‌سازی پیاپی بر محیط کشت MRS آگار تعداد باکتری‌های زنده مانده شمارش شدند [٦].

جهت انجام آزمون مقاومت به نمک‌های صفراوی، سویه مورد نظر پس از فعال‌سازی در محیط MRS براث (انکوبه کردن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت) به میزان ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت MRS آگار حاوی ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد از نمک صفراوی کشت داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت تحت شرایط بی‌هوازی قرار گرفته و پس از گذشت زمان گرمخانه‌گذاری، نتایج به صورت چشمی بررسی شد [۳].

۲-۲-۲- هیدروفوبیستی سطح سلول[2]

هیدروفوبیستی سطحی به عنوان شاخصی از تمایل باکتری‌ها جهت اتصال به حلال‌های غیرقطبی مطرح می‌گردد. در واقع، هیدروفوبیستی بالا، این پتانسیل را به آن‌ها می‌دهد که از محیط آبی به محیط آلی یا غیرقطبی نقل مکان نموده و باعث می‌شود باکتری به ذرات هیدروکربنی روی سلول یا سطوح مخاطی بچسبد. در ابتدا، کشت شبانه‌ای از باکتری‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در سانتریفیوژ با سرعت ٦۰۰۰rpm قرار می‌گیرد. سپس توسط بافر فسفات استریل و سرد شستشو داده شده و مجدداً سوسپانسیون تهیه می‌گردد. OD در ٦۰۰ نانومتر روی ۰/٦ تنظیم شد (A_1). از سوسپانسیون هر باکتری به مقدار ٤ میلی‌لیتر با ۲ میلی‌لیتر ان-هگزادکان مخلوط و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شدند. ۱ ساعت در دمای محیط قرار گرفته تا انتقال باکتری بین دو فاز انجام شود و در نهایت جذب محلول آبی در طول موج ٦۰۰ نانومتر قرائت شد (A_2) [۸]. هیدروفوبیستی از طریق معادله زیر به دست می‌آید:

$$\text{درصد هیدروفوبیستی} = \left[\frac{A_1 - A_2}{A_1}\right] \times 100$$

۲-۲-۳- آزمون DNase، فعالیت همولیتیک و آمین بیوژنیک

مطابق با پژوهش وسیعی و همکاران (۲۰۲۰)، فعالیت DNase تعیین شد. طبق آن، در مرحله اول، *L. fermentum* ARD2 روی محیط DNase به صورت خطی کشت داده شد. پس از ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تولید آنزیم بررسی گردید [۹].

فعالیت همولیتیک سویه‌ها از طریق کشت خطی بر روی محیط Tryptic Soy Agar (مرک، آلمان) با ۷ درصد (حجمی/حجمی) خون گوسفند انجام گرفت. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفتند. تغییرات رنگی ایجادشده مورد بررسی قرار گرفت. تشکیل هاله شفاف، هاله سبز رنگ یا عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی ها به ترتیب نشان دهنده β-hemolysis، α-hemolysis و γ-hemolysis است. در این آزمون از باکتری های *Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* به عنوان نمونه کنترل برای β-hemolysis و α-hemolysis استفاده شد[۹ و ۱۰].

محیط کشت حاوی آمینواسیدهای پیش‌ساز از جمله ال-هیستیدین مونوهیدروکلرید، نمک تیروزین دی سدیم، ال-اورنیتین، مونوهیدروکلرید و ال-لیزین مونوهیدروکلرید طراحی شده توسط برزگر و همکاران (۲۰۲۱)، جهت تشخیص توانایی سویه برای تولید آمین بیوژنیک با دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه استفاده شد. *L. fermentum*

[2] Cell surface hydrophobicity

ARD2 روی محیط کشت MRS براث حاوی ۰/۱ درصد از هر اسیدآمینه پیش‌ساز و ۰/۰۰۵ درصد پیریدوکسال ۵- فسفات کشت داده شد. سپس سویه‌ها بر محیط MRS آگار دارای اسیدآمینه و فاقد آن که حاوی ۰/۰٦ درصد بروموکرزول بنفش (سیگما) بود، تشخیص داده شدند. پس از گذشت ۲ الی ۵ روز گرمخانه‌گذاری، ایجاد رنگ بنفش در کلونی‌های اطراف، به عنوان نتیجه مثبت در نظر گرفته شدند [۷].

۲-۲-٤- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مطابق با روش علیزاده بهبهانی و همکاران (۲۰۲۳)، اثر سویه مورد نظر بر فعالیت مهار رادیکال DPPH و ABTS بررسی گردید. پس از کشت سویه در محیط MRS آگار به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه ۲ مرتبه با بافر فسفات سالین (PBS) شسته و ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰rpm انجام گرفت. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۲و۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، از ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی DPPH (۰/۱٤ میلی‌مولار) و ۲ میلی‌لیتر از نمونه باکتریایی با هم ترکیب شده و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان جذب در طول موج ۵۷۱ نانومتر نشان‌دهنده ظرفیت جداسازی جهت خنثی کردن رادیکال‌های DPPH است [۱۰].

جهت انجام روش ABTS، ابتدا محلول ABTS با مخلوط کردن ۷ میلی‌مولار ABTS (سیگما، آلدریچ) و ۲/٤۵ میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم (Daejung chemical and metals, Siheung , Korea) تهیه شد. سپس ٦۰۰ میکرولیتر از محلول مذکور و ۳۰۰ میکرولیتر از نمونه ادغام شده و به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شدند. در طول موج ۷۳٤ نانومتر میزان جذب خوانده شد و فعالیت مهار رادیکال به روش ABTS از رابطه زیر محاسبه گردید [۱۱].

$$\text{درصد مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد} = \left(1 - \frac{A_{\text{نمونه}}}{A_{\text{شاهد}}}\right) \times 100$$

۲-۲-۵- جذب کلسترول

Oxbile (Oxgall) (نمک صفراوی ۰/۳ درصد) به همراه پلی‌اکسی اتانیل-کلسترول سبکات به MRS براث افزوده شد. محیط دارای ۱۰۰ میکرولیتر کلسترول بود. ۱٪ از کشت تلقیح داده شد و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت در محیط بی‌هوازی نگهداری شد. نمونه کنترل براث فاقد کشت بود [۱۰].

$$\text{درصد جذب کلسترول} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

۲-۲-٦- مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فعالیت ضدمیکروبی

به منظور تشخیص و بررسی میزان مقاومت و یا حساسیت *L. fermentum* ARD2 نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی، از محیط کشت جامد میکروارگانیسم، سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی محیط MRS آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک Imipenom، Vancomycin، Nitrofurantion، Chloramphenical، Ciprofloxacin، Penicillin، Nalidixic، Gentamicin روی محیط کشت قرار گرفت. پلیت‌ها در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شده و پس از گذشت ۲٤ ساعت، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل از آن بر حسب میلی‌متر گزارش گردید [۳].

جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه *L. fermentum* ARD2 علیه پاتوژن‌های بیماری‌زا رایج از روش‌های انتشار به کمک چاهک آگار (Well Diffusion Agar) و دیسک دیفیوژن (Disk Diffusion Agar) استفاده شد. در آزمون مورد بررسی از ۳ سویه بیماری‌زا گرم مثبت *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Listeria monosytogenes* ATCC 19115، *Bacillus cereus* ATCC 14579 و ۳ سویه بیماری‌زا گرم منفی نظیر *Shigella dysenteriae* PTCC 1188، *Salmonella typhimurium* PTCC 1609 و *Escherichia coli* ATCC 25922 استفاده

گردید. در مرحله اول، سویه مورد نظر، روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شده و به مدت ۲٤ ساعت در جار بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شد. پس از آن، از کلونی‌های رشد یافته در محیط MRS آگار، در محیط MRS براث تلقیح شده و در جار بی‌هوازی به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد صورت پذیرفت. قسمتی از سوپرناتانت فاقد سلول با pH اولیه که به علت فعالیت میکروارگانیسم‌ها و تولید اسیدهای ارگانیک ایجاد شده، مورد استفاده قرار گرفت (aCFS) و pH بخش دیگر سوپرناتانت توسط سدیم هیدروکسید روی ۵/۵ تنظیم گردید و جهت سنجش فعالیت ضد میکروبی استفاده شد (nCFS). برای اطمینان از عاری بودن هر دو نوع سوپرناتانت از سلول، با استفاده از فیلتر سر سرنگی و دستگاه خشک‌کن انجمادی لیوفیلیزه گردید (انجماد در دمای ٤۵- درجه سانتی‌گراد و حرارت‌دهی تحت خلأ ۰/۳۸ میلی‌بار در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۰ ساعت). با استفاده از ۲ میلی‌لیتر آب مقطر، پودرهای لیوفیلیزه شده از هر دو نوع سوپرناتانت استریل شده و پتانسیل ضد میکروبی آن‌ها با روش انتشار در اگار بررسی شد. از هر سویه‌های پاتوژن ذکر شده، غلظتی معادل نیم مک فارلند تهیه شده و بر محیط MHA (مرک، آلمان) کشت داده شد. سپس چاهک‌هایی با استفاده از انتهای پیپت استریل به قطر ٦ میلی‌متر بر روی محیط ایجاد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت اسیدی و خنثی شده باکتری، درون چاهک‌ها ریخته شد. در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شده و با استفاده از خط‌کش قطر هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری شد [۸].

جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی به روش دیسک دیفیوزن آگار از روش فلاح و همکاران (۱۳۹۸)، با اندکی تغییر استفاده گردید. در این روش، ابتدا سویه لاکتیکی در محیط کشت MRS براث و باکتری‌های شاخص بیماری‌زا در محیط کشت MHB به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تلقیح شدند. سپس از باکتری‌های اسید لاکتیک و شاخص‌های بیماری استاندارد نیم مک فارلند تهیه شد. دیسک‌های کاغذی (پادتن طب، ایران) به قطر ٦ میلی‌متر به مدت ۱۵ دقیقه در عصاره باکتری غوطه‌ور گردید و روی پلیت‌های MRS آگار کشت داده شده با پاتوژن‌ها قرار داده شد و قطر هاله عدم رشد پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با استفاده از خط‌کش بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری گردید [۲].

۲-۳- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۷ و به روش تجزیه واریانس یک‌طرفه صورت پذیرفت. آزمون چند دامنه‌ای دانکن و سطح اطمینان ۹۵ درصد جهت مقایسه میانگین‌ها به کار رفت و جهت رسم نمودارها از Excel 2013 استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی

در شکل ۱، میزان زنده‌مانی *L. fermentum* ARD2 در درصدهای مختلف pH نشان داده شده است. مطابق با شکل ۱، pHهای پایین و افزایش زمان نگهداری در آن بر تعداد سلول‌های زنده تأثیرگذار است. نتایج مقاومت به اسید نشان داد که تعداد سلول‌های زنده سویه *L. fermentum* ARD2 با افزایش pH از ۲ به ٤، افزایش یافته و با افزایش زمان از صفر به ۳ ساعت در pH ثابت روند کاهشی مشاهده گردید.

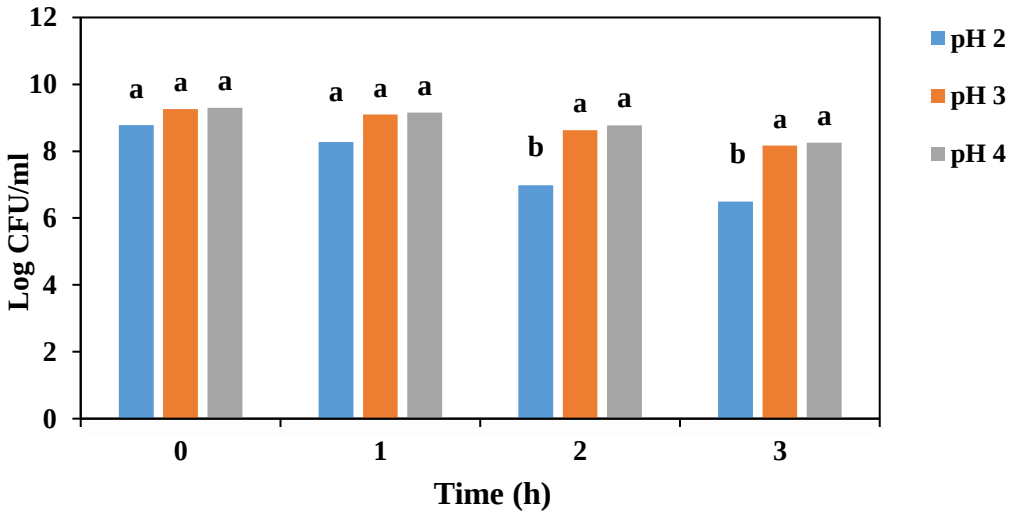

Fig. 1. The survivability of *L. fermentum* ARD2 under acidic pHs. The presence of different superscript letters indicates that there are significant differences ($p < 0.05$) between the means.

در پژوهش حاضر، مقاومت سویه *L. fermentum* ARD2 به غلظت‌های مختلف (۰/۳، ۰/۵ و ۰/۷ درصد وزنی/حجمی) نمک‌های صفراوی بررسی گردید. مطابق با جدول ۱، *L. fermentum* ARD2 در غلظت‌های پایین نمک‌های صفراوی رشد کرده و مقاومت نشان داده است و پس از افزایش غلظت به ۰/۷ رشد متوقف گردید.

Table 1. The effect of different concentration of bile salt on the viability of the strain *L. fermentum* ARD2

Survivability	0.3%	0.5%	0.7%	Control
	Growth	Growth	Not grown	Growth

تعیین میزان زنده بودن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیکی در مواد غذایی و دستگاه گوارش (قرارگیری در معرض محیط اسیدی معده (pH=۱/۵-۳/۵) و نمک صفراوی) یک ویژگی اساسی در انتخاب گونه‌هایی است که در تولید غذاهای پروبیوتیکی مد نظر می‌باشد و باید تحت این شرایط زنده بمانند. تولید بعضی ترکیبات پلی‌ساکاریدی توسط باکتری، دلیل مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک به شرایط اسیدی می‌باشد که از تأثیر اسید بر غشای سلول ممانعت به عمل می‌آورد. علاوه بر آن، چندین مکانیسم در تنظیم مقاومت به اسید در باکتری‌های اسید لاکتیک وجود دارد که شامل: مسیرهای متابولیک مرکزی، پمپ پروتون، تغییرات ترکیب غشای سلولی و تراکم سلولی، ترمیم آسیب DNA و پروتئین و نیز فرآیندهای خنثی‌سازی دخیل هستند. نمک‌های کیسه صفرا با از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، نقش مهم و اساسی در دفاع اختصاصی روده ایفا می‌کنند، بنابراین بررسی زنده‌مانی سویه در غلظت‌های مختلف نمک‌های صفراوی برای اثبات پتانسیل پروبیوتیکی ضروری است. سویه‌های متعلق به جنس *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* موجود در روده، دارای هیدرولاز نمک صفراوی هستند که اسیدهای صفراوی اولیه را به نمک‌های صفراوی ثانویه نسبتاً کمتر تبدیل می‌کند [۲، ۳ و ۱۱] . مومن‌زاده و همکاران (۱۴۰۰)، تأثیر pHهای مختلف را بر درصد زنده‌مانی *L. fermentum* بررسی نموده و گزارش کردند که این باکتری در pH=۲/۵ توانایی بقا نداشته اما در pH=۳/۵ و pH=۵/۵ به ترتیب به میزان ۹۲ درصد و ۹۹ درصد زنده‌مانی داشت و در غلظت‌های پایین نمک‌های صفراوی رشد بیشتری مشاهده شد (غلظت ۰/۲ درصد) [۳]. همچنین Paniker و همکاران (۲۰۱۸) و توکلی و همکاران (۱۳۹۵) اثر pHهای مختلف (۲، ۲/۵، ۳/۵ و ۶/۵) و نمک‌های صفراوی برابر سویه‌های مختلف *L. fermentum* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج

حاکی از آن بود که با حداقل از بین رفتن سلول، سویه توانست pH کم و نیز غلظت صفرا را تحمل کند [۱۲ و ۱۳]. نتایج گزارش شده با پژوهش حاضر مطابقت داشت به طوری که با افزایش pH و درصدهای پایین نمک‌های صفراوی (۰/۳ درصد) زنده‌مانی سویه بیشتر بود بنابراین می‌توان گفت سویه مورد آزمایش توانایی بیشتری جهت زنده‌مانی در pHهای نزدیک به خنثی دارد در حالی که قرارگیری در pH=۲/۵ به مدت ٤ ساعت کاهش رشد مشاهده شد. نادعلیزاده طبری و همکاران (۱۳۹۸) *Lactobacillus*های جدا شده از روده قزل‌آلای رنگین‌کمان را بررسی نمودند و گزارش کردند مقاومت سویه‌های *Lactobacillus* در برابر نمک صفراوی ۰/۳ درصد متفاوت بوده و *L. fermentum* توانایی مقاومت نسبی در برابر نمک صفراوی داشت. میزان مقاومت در بین سویه‌های مختلف باکتریایی، ناشی از تفاوت در توانایی جهت کاهش اثرات دترجنتی نمک‌های صفراوی است [۱٤]. Garcia و همکاران (۲۰۱۷) نیز بیان کردند تمام سویه‌های مختلف *L. fermentum* به pH=۲ حساس بوده اما توانایی زنده‌مانی در pH=۳ را پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون داشتند [۱۵]. پژوهشگران دیگری نیز به نتایج مشابهی دست یافتند [۱٦-۲۰].

۳-۲- هیدروفوبیستی سطح سلول

ظرفیت سویه‌ها جهت اتصال به منابع غیرقطبی از طریق هیدروفوبیستی یا آبگریزی توضیح داده می‌شود که توسط اجزای آبگریز موجود در غشای خارجی باکتری‌ها ایجاد شده و از منابعی مانند ان-هگزادکان، کلروفرم و اتیل استات برای بررسی این ویژگی استفاده می‌گردد. بر اساس مخلوط نمودن محلول غیرقطبی و سوسپانسیون میکروبی و اندازه‌گیری OD_{600} سطح آبی، قبل و بعد از افزودن محلول محاسبه می‌شود. در صورت کاهش جذب سوسپانسیون بعد از قرارگیری در معرض هیدروکربن‌ها، خاصیت آبگریزی باکتری تشخیص داده می‌شود[۸]. در خصوص *L. fermentum* ARD2 میزان ۰/۵ ±۵۰/٦۰ به دست آمد.

یکی از فاکتورهای لازم برای باکتری‌ها جهت چسبندگی به سطوح مختلف و تحت تأثیر قرار دادن بافت میزبان، هیدروفوبیستی است که به فاکتورهای زیادی همچون بار الکتریکی سطح، نیروی گرانش، نیروی واندروالس و حرکت براونی مرتبط می‌باشد. این ویژگی به دلیل وجود برخی ترکیبات در سطح سلول مانند پلی‌ساکارید، اسید چرب و پروتئین می‌باشد و از این طریق اتصال میکروارگانیسم به سلول روده ممکن می‌گردد. به علاوه، اتصال کووالانسی سلول به موکوز روده وابسته به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشای سلول و وجود ترکیباتی همانند ترکیبات پروتئینی، تیکنوئیک اسیدها، پلی‌ساکاریدی و برخی اسیدهای چرب بوده که بر خاصیت آبگریزی ارگانیسم تأثیر دارد. تیکوئیک اسید در سطح دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک به شکل لیپوتیکوئیک اسید وجود داشته که خاصیت پلی‌الکترولیتیکی دارد، همچنین وجود پیوند غیرکووالانسی لایه S پروتئینی در *Lactobacillus*ها منجر به ایجاد این خاصیت می‌شود. آبگریزی در صنعت غذا حائز اهمیت است؛ به ویژه برای باکتری‌هایی که به عنوان کشت همراه یا آغازگر به طور گسترده در صنعت لبنی مورد استفاده قرار می‌گیرند، میل ترکیبی آن‌ها جهت اتصال به چربی شیر و ترکیبات معطر می‌تواند سبب تغییر ثبات امولسیون‌ها گردد [۲ و ۸]. حق‌شناس و همکاران (۲۰۲۳)، طی بررسی ۵ سویه *Lactobacillus* جدا شده از کشک نشان دادند که تمام سویه‌ها دارای خاصیت آبگریزی هستند [۲۱]. در پژوهشی دیگر، طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۹)، هیدروفوبیستی مختلف 4-17 *L. fermentum* را برابر ٤۳ درصد گزارش کردند [۱۷]. Garcia و همکاران (۲۰۱۷)، پس از بررسی سویه مختلف *L. fermentum* UCO-979C دریافتند که سویه ظرفیت بالایی جهت چسبیدن به سلول را دارد [۱۵].

۳-۳- DNase، فعالیت همولیتیکی و تولید آمین‌های بیوژنیک

طبق مشاهدات، نتیجه تست تولید DNase توسط *L. fermentum* ARD2 منفی بوده است و در اطراف کلنی‌ها بر محیط کشت، ناحیه مشخصی رویت نشد. نتیجه منفی تست

فعالیت همولیتیکی نشان‌دهنده عدم تجزیه خون توسط سویه و در نهایت عدم بیماری‌زایی آن می‌باشد.آمین‌های بیوژنیک بازهای آلی با فعالیت بیولوژیکی هستند که به طور عمده توسط دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه تولید می‌گردند. مواد غذایی مانند فرآورده‌های گوشتی و دریایی، محصولات لبنی، سبزیجات، میوه و آجیل‌ها طیف وسیعی از آمین‌های بیوژنیک را دارا هستند [۲۲]. از این رو، شناسایی و کنترل این ترکیبات نقش به سزایی در کاهش مسمومیت دارد. در پژوهش انجام شده تولید آمین بیوژنیک توسط سویه *L. fermentum* ARD2 مشاهده نگردید. مطابق با نتایج، سویه *L. fermentum* ARD2 خواص همولیتیکی، تولید DNase و آمین بیوژنیک را نشان نداد. در نتیجه این سویه از باکتری می‌تواند به طور بالقوه در راستای افزایش سلامت عمومی مورد استفاده قرار گیرد؛ فقدان فعالیت همولیتیک برای باکتری ضروری است زیرا همولیز باعث افزایش دسترسی ارگانیسم به آهن شده و ابتلا به کم خونی در افراد را افزایش دهد [۱۱]. به علاوه، آمین‌های تولیدی می‌توانند اثرات مضر متعددی از جمله افزایش فشار خون، تهوع، اسهال، سردرد، مشکلات تنفسی و پوستی ایجاد کنند [۱۵]. امیدوار و همکاران (۱۳۹۸)، در پژوهشی خواص پروبیوتیکی *L. fermentum* جدا شده از عسل را بررسی و نتیجه گرفتند سویه‌های مورد نظر فعالیت همولیتیکی نداشتند [۱۶]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر *Lac. fermentum* UCO-979C آمین بیوژنیک تولید نکرد و فاقد فعالیت همولیتیکی بود که با نتایج حاصل از پژوهش حاضر همخوانی داشت [۱۵]. خواص پروبیوتیکی و ایمونولوژیکی *Lactobacillus*های جدا شده از کیمچی توسط Lee و همکاران (۲۰۲۳)، انجام پذیرفت و مشاهدات نشان داد که همه سویه‌های مطالعه شده فاقد فعالیت همولیتیکی بودند [۲۳]. باقری و همکاران (۱۳۹۹)، نیز به نتایج مشابهی در ارتباط با خواص ایمنی *Lactobacillus*ها دست یافتند [۲٤].

۳-٤- ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی DPPH و ABTS

نتایج حاصل از میزان مهار رادیکال آزاد توسط *L. fermentum* ARD2 در شکل ۲، نشان داده شده است.

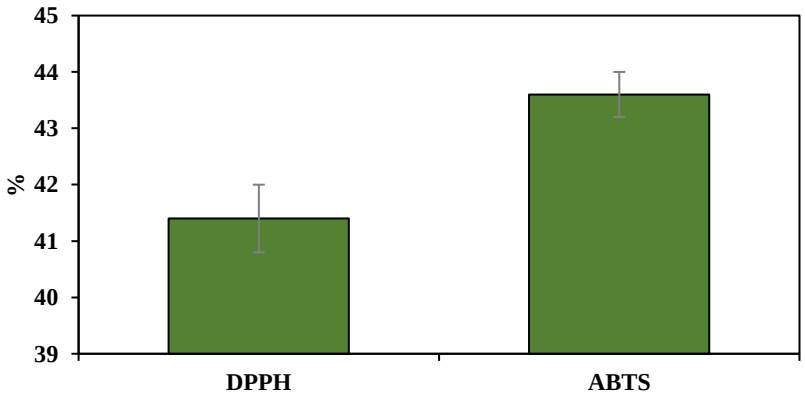

Fig. 2. The antioxidant activity (DPPH & ABTS) of *L. fermentum* ARD2.

استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل میان عملکردهای اکسیدانی و آنتی‌اکسیدانی است. بدن انسان سیستم دفاعی در برابر اکسیدان‌ها دارد و زمانی که ROS[3] انباشته شده بیشتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی گردد، اکسیداسیون بیش از حد لیپید، پروتئین و نوکلئیک اسیدها و آسیب سلولی گردند و باعث بروز سرطان، التهاب، سیروز و بیماری‌های قلبی و عروقی شوند. بنابراین آنتی‌اکسیدان‌های خارجی برای کاهش استرس اکسیداتیو یا بهبود توانایی آنتی‌اکسیدانی فردی مورد نیاز هستند. نقش باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های حاصل از آن‌ها به عنوان آنتی‌اکسیدان در حفظ سلامت انسان و جلوگیری از ابتلا به برخی بیماری‌ها اثبات شده است.

[3] Reactive oxygen species

اجزای آنتی‌اکسیدانی در باکتری‌های اسید لاکتیک شامل: اگزوپلی‌ساکاریدهای باکتریایی، پپتیدهای زیست‌فعال، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و یون منگنز می‌باشد علاوه بر این، میکروفلور طبیعی روده می‌تواند آنتی‌اکسیدان‌های غذایی فعال زیستی را از طریق فرآیندهای زیستی با استفاده از واکنش‌های آنزیمی تولید کند [۱۱ و ۲۵]. میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS سویه مختلف *L. fermentum* ARD2 به ترتیب برابر با ٤۱/٤۰ و ٤۳/٦۰ درصد به دست آمد. Chooruk و همکاران [۲۰۱۷] گزارش کردند که *L. fermentum*، *L. casei* و *L. rhamnosus* دارای فعالیت DPPH بیش از ٦۰ درصد بودند [۲٦]. نتایج حاصل از مطالعه Kim و همکاران (۲۰۲۲)، نیز نشان داد *Lactobacillus*های مشتق شده از مواد غذایی دارای درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در محدوده ٦/۸۸-۲/٥٥ درصد و مهار رادیکال ABTS در محدوده ۸٦/۲٦-۱۹/٦۹ درصد بود [۲۷]. Hu و همکاران (۲۰۲۲)، نتیجه گرفتند *L. fermentum* HDY02 به دست آمده از شیر سویای تخمیر شده توانایی آنتی‌اکسیدانی داشت [۲۸].

۳-٥- جذب کلسترول

کلسترول یکی از اجزای اصلی بافت بدن می‌باشد اما دریافت و تجمع بیش از حد آن در بدن موجب افزایش کلسترول و ابتلا به بیماری‌های مرتبط با آن همانند بیماری‌های قلبی و عروقی و انواع سرطان شده که در نهایت سبب بالا رفتن نرخ مرگ و میر خواهد شد. امروزه جهت درمان و کاهش میزان کلسترول از درمان‌های دارویی استفاده می‌گردد با این حال مصرف دارو در دراز مدت، باعث بروز برخی مشکلات گوارشی شده و اثر منفی بر سلامت کلی بدن می‌گذارد. مصرف مواد غذایی حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای کاهش خطرات گفته شده است زیرا که باکتری‌های اسید لاکتیک منجر به بهبود عملکرد روده و حفظ تعادل آن و در نتیجه افزایش سیستم ایمنی بدن و کاهش کلسترول می‌گردند [۲۹ و ۳۰]. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد *L. fermentum* ARD2 به میزان ۳۸/٦۰±۰/٥٤ درصد توانست کلسترول را کاهش دهد. در مطالعه‌ای سویه‌ی *L. fermentum* جدا شده از کشک توانایی حذف کلسترول را داشت [۲۱].

۳-٦- مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و فعالیت ضدمیکروبی

نتایج میزان مقاومت *L. fermentum* ARD2 به آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی در جدول ۲، آورده شده است. نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که *L. fermentum* ARD2 نسبت به Vancomycin، Gentamicin، Chloramphenicol، Nalidixic و Imipenem حساس، در برابر Ciprofloxacin مقاومت نشان داده و به Nitrofurazone و Penicillin نیمه حساس بود. دو ویژگی مهم و حیاتی باکتری‌های مفید برای انسان عبارتند از فعالیت ضد میکروبی آن‌ها و ارزیابی ایمنی باکتری است. بررسی حساسیت باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به انواع رایج و درمانی آنتی‌بیوتیک‌ها برای بررسی ایمنی آن‌ها امری ضروری به نظر می‌رسد؛ به طوری که، مشخص شده است مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند آثار منفی برای باکتری‌ها داشته باشد زیرا که ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک توانایی انتقال به باکتری‌های مضر و بیماری‌زای موجود در دستگاه گوارش را دارند و این انتقال سبب ایجاد مقاومت در سویه‌های پاتوژن در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها خواهد شد و در صورت بیماری، درمان‌های مرتبط با آنتی‌بیوتیک مؤثر نخواند بود. برخی از گونه‌های متعلق به *Lactobacillus*ها به عنوان پروبیوتیک عمل کرده و بلع آن‌ها مزایای بی‌شماری برای سلامتی از جمله تحریک و تنظیم سیستم ایمنی بدن و کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا دارد. فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند باعث کنترل فرآیند تخمیر و افزایش ماندگاری محصولات شوند، همچنین ترکیبات ضد میکروبی از قبیل باکتریوسین‌ها می‌توانند به عنوان افزودنی مواد غذایی اضافه گردند. باکتریوسین‌ها، پپتیدها یا پروتئین‌های سنتز شده توسط ریبوزوم هستند که معمولاً مانع رشد پاتوژن‌های گرم مثبت می‌شوند. در خصوص انواع گرم منفی فعالیت ضد

میکروبی مربوط به حضور اسیدهای آلی، اسیدهای چرب هیدروکسی، دی‌استیل، فنول‌ها، ترکیبات پروتئینی و هیدروژن پراکسید است. گونه‌های مختلف *Lactobacillus* برای تولید ترکیبات مختلف ضد میکروبی علیه باکتری‌های شاخص عامل فساد شناسایی و مطالعه شده‌اند، از طرفی این سویه‌ها می‌توانند همانند آنتی‌بیوتیک‌ها به کاهش عفونت کمک کنند و این فعالیت ضد میکروبی عمدتاً به سنتز اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و فنیل لاکتیک اسید مربوط می‌شود [۵ و ۳۱]. نتایج به دست آمده از مطالعه Garcia و همکاران (۲۰۱۷)، نشان داد که *L. fermentum* UCO-979C نسبت به Penicillin حساسیت نشان داد که نشان‌دهنده عدم مقاومت پلاسمید است، همچنین نسبت به Amoxicillin، Ciprofloxacin، Chloramphenicol و Gentamicin حساس بود [۱۵]. *L. fermentum* یکی از Lactobacillusهای جدا شده از کیمچی بود که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های Ampicillin، Gentamicin، Chloramphenicol و Clindamycin حساسیت نشان داد [۲۳]. Abid و همکاران (۲۰۲۲)، نیز نتیجه گرفتند *L. fermentum* جدا شده از شیر گاومیش نسبت به Erythromycin، Clindamycin و Ampicillin حساس و در برابر Gentamicin، Ampicillin و Chloramphenicol مقاوم بود [۱۹]. نتایج مطالعه مؤمن‌زاده و همکاران نیز نشان داد *L. fermentum* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های Chloramphenicol، تتراسایکلین، Penicillin حساس و نسبت به Gentamicin نیمه حساس بود [۳]. سویه‌های *L. fermentum* MA-7 و *L. fermentum* MA-8 حساسیت متوسطی نسبت به Chloramphenicol داشته و در برابر Gentamicin و Nalidixic Acid مقاوم و Penicillin حساس بود [۱۸]. Boricha و همکاران (۲۰۱۹) مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های *L. fermentum* با منشأ غذایی و انسانی به نتایج مشابهی رسیدند [۳۲].

Table 2. Effect of common antibiotics on the growth of *L. fermentum* ARD2

Antibiotic	*L. fermentum* ARD2
Vancomycin	**Sensitive**
Gentamicin	**Sensitive**
Chloramphenicol	**Sensitive**
Nitrofurazone	**Intermediate**
Nalidixic	**Sensitive**
Penicillin	**Intermediate**
Imipenem	**Sensitive**
Ciprofloxacin	**Resistance**

نتایج حاصل از اثر ضد میکروبی سویه *L. fermentum* ARD2 بر برخی از باکتری‌های شاخص بیماری‌زایی به روش دیسک دیفیوژن اگار و چاهک آگار در شکل‌های ۳ و ٤ نشان داده شده است. در هر دو روش سویه *L. fermentum* ARD2 فاقد اثر ضد میکروبی روی *E. coli* بود.

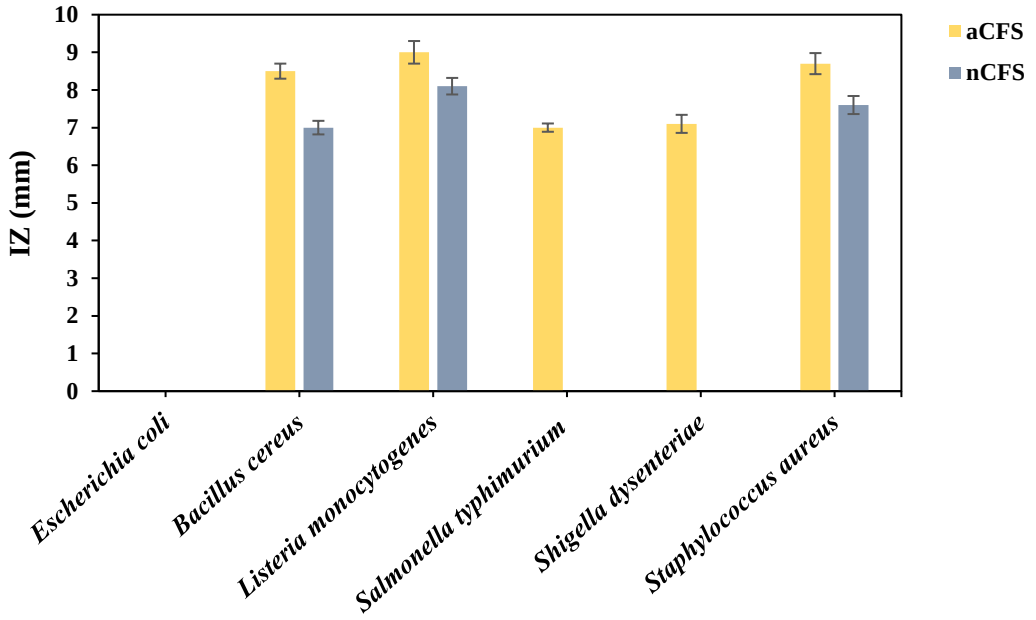

Fig. 3. Antimicrobial activity of *L. fermentum* ARD2 based on well diffusion agar method. Cell-free supernatants (CFS); acid and neutralized CFS (aCFS and nCFS).

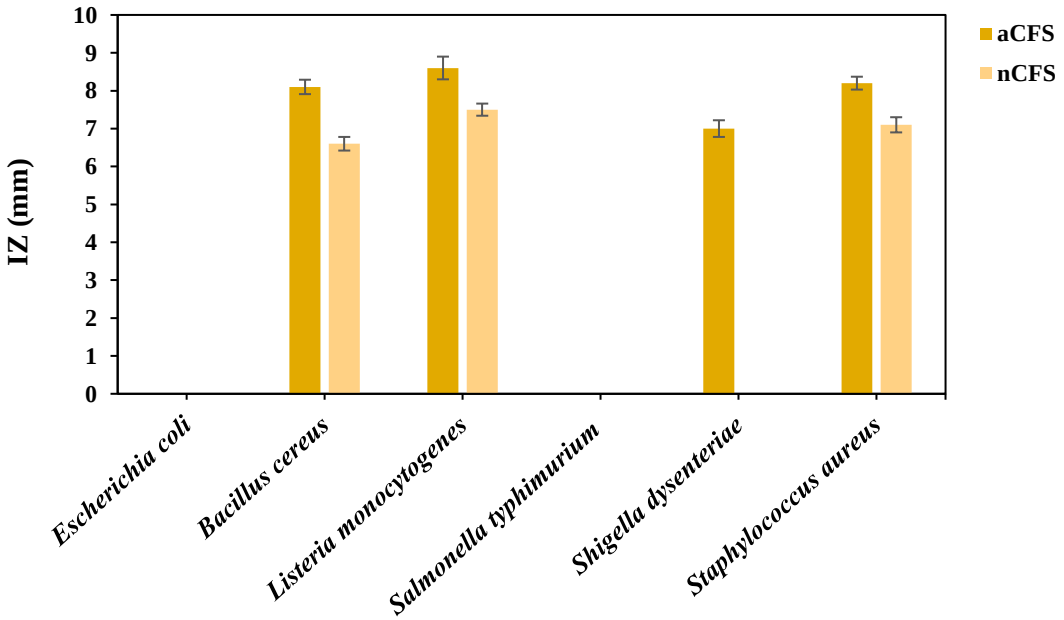

Fig. 3. Antimicrobial activity of *L. fermentum* ARD2 based on disk diffusion agar method. Cell-free supernatants (CFS); acid and neutralized CFS (aCFS and nCFS).

با استفاده از روش دیسک و چاهک اثر ضد میکروبی *L. fermentum* ARD2 بررسی گردید و نتایج نشان داد در روش چاهک، سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول (aCFS) فاقد اثر ضد میکروبی بر *E. coli* بوده، سوپرناتانت خنثی شده فاقد سلول (nCFS) علاوه بر *E. coli*، بر روی *S. typhimurium* و *S. dysenteriae* بی‌تأثیر، بیشترین اثر ضد میکروبی aCFS مربوط به *L. monosytogenes* با قطر هاله ۹ میلی‌متر و *S. auerus* با قطر هاله ۸/۷ بود. از طرفی سوپرناتانت خنثی شده فاقد سلول بر *L. monosytogenes* هاله بزرگتری نسبت به سایرین (۸/۱ میلی‌متر) تشکیل داد که به معنای اثر بیشتر

آن بود. در روش دیسک، همانند روش چاهک، aCFS هیچگونه اثر ضد میکروبی بر *E. coli* و *S. typhimurium* نداشت و nCFS علاوه بر پاتوژن‌های نامبرده، فاقد اثر ضد میکروبی بر *S. dysenteriae* بود. بیشترین تأثیر aCFS و nCFS بر روی *L. monosytogenes* به ترتیب با قطر هاله ۸/٦ و ۷/۵ میلی‌متر مشاهده گردید و aCFS رشد *S. auerus* را نیز محدود نمود (قطر هاله ۸/۲ میلی‌متر). طباطبایی یزدی و همکاران (۲۰۱۹) اثر ضدمیکروبی *L. fermentum* 4-17 روی باکتری‌های پاتوژن *E. coli*، *S. auerus* ، *P. aeruginosa* و *S. typhi* بررسی نمودند و بیشترین و کمترین اثر ضد میکروبی به ترتیب روی *S. auerus* و *E. coli* مشاهده گردید و نشان داد اثر ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها بر سویه‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی‌ها می‌باشد. در باکتری‌های گرم منفی ، مکانیسم نابودی باکتری‌ها بر اساس تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدرژن، اسیدهای چرب هیدروکسی و دی‌اکسیدکربن و در باکتری‌های گرم مثبت مرتبط با باکتریوسین‌های حساس به پروتئاز است [۱۷]. Abid و همکاران (۲۰۲۲) بیان کردند *L. fermentum* جدا شده از شیر گاومیش به طور چشمگیری در برابر پاتوژن‌هایی همانند *P. aeruginosa*، *S. auerus*، *L. monosytogenes*، *B. cereus* و *E. coli* مقاومت نشان داد [۱۹]. پژوهش حق‌شناس و همکاران (۲۰۲۳) نیز اثر ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus* جدا شده شده از کشک را نشان داد [۲۱]. مطابق با مطالعه ابراهیمی و همکاران (۱۳۹۷) ترکیبات شبه باکتریوسینی که توسط *L. fermentum* جدا شده از چال (فرآورده تخمیری سنتی شیر شتر) تولید شدند فعالیت ضد میکروبی قابل قبولی داشت [۳۳]. به طور کلی می‌توان بیان کرد پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها قابلیت بالایی برای استفاده غذایی و دارویی دارد [۳٤-۵۱].

٤- نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های به دست آمده از این پژوهش حاضر، *L. fermentum* ARD2 دارای توانایی تحمل pHها و درصدهای نمک‌های صفراوی بود. همچنین قابلیت خوبی در مهار باکتری‌های پاتوژن داشت و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم درمانی حساسیت نشان داد؛ از این رو نگرانی‌های مرتبط با انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به باکتری‌های بیماری‌زا وجود ندارد. علاوه بر موارد فوق فعالیت همولیتیکی، DNase و تولید آمین بیوژنیک مشاهده نگردید و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد و جذب کلسترول را داشت؛ بنابراین باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان فلور طبیعی دستگاه گوارش حائز اهمیت بوده و می‌توان محصولات لبنی و تخمیری را منابعی مفید از آن‌ها معرفی نمود. بر همین اساس سویه مورد نظر ویژگی‌های عملکردی و فعالیت ضد میکروبی مناسبی داشت با این حال، استفاده از آن در محصولات غذایی فراسودمند، مستلزم انجام سایر آزمون‌ها جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک و نگهدارنده طبیعی در محصولات مذکور می‌باشد.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به‌شماره ۱٤۰۲/۵۳ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

٦- منابع

[1] Jooyandeh H, Alizadeh Behbahani B, Noshad M. The effect of inulin on the viability of Lactobacillus fermentum strain 4-17 in probiotic ice cream and evaluation of its microbial and physicochemical properties. FSCT .2021; 18 (113):91-100

[2] Falah F, Mortazavi SA, Tabatabaei Yazdi, F. Evaluation of properties of Lactobacillus bervis strain PML1 based on the ability to adhere to the epithelial cells of intestine. Applied Microbiology in Food industries. 2019; 5(1): 41-53.

[3] Momenzadeh, Sara, Joyandeh, Hossein, Alizadeh Behbahani, Behrouz, Barzegar, Hassan. Evaluation of probiotic and antibacterial properties of Lactobacillus fermentum SL163. Iranian Food Science and

Technology Research. 2021. Journal.Vol. 17, No. 2, p. 233-242.

[4] Farahbakhsh M, Hakimi H, Bahram Abadi R, Zolfaghari M, Doraki N. Isolation of Probiotic Lactobacilli from Traditional Yogurts Produced in Rural Areas of Rafsanjan and their Antimicrobial Effects, 20012. Journal of Rafsanjan university of medicine. 2013; 12 (9):733-746

[5] Alizadeh Behbahani B., Nishad M, Jooyandeh H. Investigation of technological characteristics of Lactobacillus casei CE28.26 and Lactobacillos acidophilus strain BCRC10695 and determination of their antimicrobial activity against foodborne pathogenic bacteria. Applied Microbiology in Food industries. 2021; 7(1): 1-16.

[6] Saboktakin-Rizi1, Mahboobe, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Hojjati, Mohammad, Noshad, Mohammad. 2021. Identification of Lactobacillus plantarum TW29-1 isolated from Iranian fermented cereal-Dairy product (Yellow Zabol Kashk): probiotic characteristics, antimicrobial activity and safety evaluation. Journal of Food Measurement and Characterization (2021) 15:2615–2624.

[7] Barzegar, Hassan, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Falah, Fereshteh. 2021. Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of Lactobacillus strains isolated from Iranian raw milk cheeses. Food Science & Nutrition published. 2021; 9:4094–4107.

[8] Noshad, Mohammad, Alizadeh Behbahani, Behrouz, Hojjati, Mohammad. 2021. Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from native Doogh of Behbahan. Journal of Food Industry Research. Volume 31, Number 4.2021.

[9] Vasiee, Alireza, Falah, Fereshteh, Alizadeh Behbahani, Behrooz, Tabatabaee-yazdi, Farideh. 2020. Probiotic characterization of Pediococcus strains isolated from Iranian cereal-dairy fermented product: Interaction with pathogenic bacteria and the enteric cell line Caco-2. Journal of Bioscience and Bioengineering. Volume 130, Issue 5, November 2020, Pages 471-479.

[10] Alizadeh Behbahani, Behrooz, Jooyandeh, Hossein, Hojjati, Mohammad, Ghodsi Sheikhjan, Mitra. 2023. Evaluation of probiotic, safety, and anti-pathogenic properties of Levilactobacillus brevis HL6, and its potential application as bio-preservatives in peach juice. Food Science and Technology. 191 (2024) 11560.

[11] Kim, Seonyoung, Ji Yeon Lee, Yulah Jeong, and Chang-Ho Kang. 2022. "Antioxidant Activity and Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria" Fermentation 8, no. 1:29.https://doi.org/10.3390/fermentation8010029.

[12] Panicker AS, Ali SA, Anand S, Panjagari NR, Kumar S, Mohanty AK, Behare PV Evaluation of some in vitro probiotic properties of Lactobacillus fermentum strains. Journal of food science and technology. 2018; 55(7): 2801-2807.

[13] Tavakoli M, Hamidi Esfahani Z, Hejazi MA, Azizi MH, Abbasi S. Probiotic Potential of Lactobacillus Strains Isolated from Mazandaran Local Cheese. Iranian J Nutr Sci Food Technol 2017; 11 (4): 87-96.

[14] Nadalizadeh Tabari N, Meshkini S, Tukmechi A. Isolation and a survey on probiotic properties of Lactobacillus in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) intestine and their antibacterial properties against Yersinia ruckeri. Iranian scientific fisheries journal. 2023; 3(29): 133-142.

[15] Garcia A, Navarro K, Sanhueza E, Pineda S, Pastene E, Quezada M, Henriquez K, Karlyshev A, Villena J, Gonzalez C. Characterization of Lactobacillus fermentum UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-Helicobacter pylori activity. Electronic journal of biotechnology. 2017; (25): 75-83.

[16] Omidvar F, Eshghi M, Nateghi L. The study of probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from honey and the possibility of producing probiotic peach juice and strawberry juice. Journal of applied microbiology in food industry. 2019; 5(2): 39-55.

[17] Falah F, Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S, Mortazavi SA, Roshanak S. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic Lactobacillus fermentum strain 4-17 against Escherichia coli causing urinary tract infection in humans. Microb Pathog. 2019 June; 131:246-253. https://doi.org/ 10.01016/j.micpath.

[18] Ozusaglam MA, Gunyakti A. Lactobacillus fermentum strains from human breast milk with probiotic properties and cholesterol-lowering effects. Food science bioethanol. 2019; 28(2): 501-509.

[19] Abid, Sana & Farid, Arshad & Abid, Rameesha & Rehman, Mujeeb & Alsanie, Walaa & Alhomrani, Majid & ALAMRI, Abdulhakeem & Mohammed, Syed & Asdaq, Syed & Hefft, Daniel & Saqib, Saddam & Muzammal, Muhammad & Morshedy, Sabrin & Alruways, Mashael & Ghazanfar, Shakira. (2022). Identification, Biochemical Characterization, and Safety Attributes of Locally Isolated Lactobacillus fermentum from Bubalus bubalis (Buffalo) Milk as a Probiotic. Microorganisms. 10.3390/microorganisms10050954.

[20] Casarotti, Sabrina & Carneiro, Bruno & Todorov, Svetoslav & Nero, Luís & Rahal, Paula & Penna, Ana. (2017). In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of Lactobacillus strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. Annals of Microbiology. https://doi.org/67. 10.1007/s13213-017-1258-2.

[21] Haghshenas, B., Kiani, A., Mansoori, S. et al. Probiotic properties and antimicrobial evaluation of silymarin-enriched Lactobacillus bacteria isolated from traditional curd. Sci Rep 13, 10916 (2023).https://doi.org/10.1038/s41598-023-37350-3

[22] Farkhondeh T, Yavarmanesh M. Biogenic amines in dairy products. 2020. The 10th national conference on sustainable agriculture and natural resources.

[23] Lee J, Kim S, Kang Ch. Screening and probiotic properties of lactic acid bacteria with potential immunostimulatory activity isolated from Kimchi. Fermentation. 2023.https://doi.org/10.3390/fermentation9010004.

[24] Bagheri F, Mirdamadi S, Mirzaei M, Safavi M. Risk assessment of isolated Lactobacillus from traditional Iranian dairy products. 2020;https://doi.org10.29252/fsct.17.07.06.

[25] Shahrampour D, Khomeiri M, Razavi MA, Kashiri M. Evaluating the effect of diversity of Lactobacillus plantarum strains isolated from different on their antagonistic, antioxidant and aggregation activities. Iranian journal of nutrition sciences and food technology. 2019: 39-53.

[26] Chooruk A, Piwat S, Teanpaisan R. Antioxidant activity of various oral Lactobacillus strains. J Appl Microbiol. 2017; 123(1): 271-279. https://doi.org. 10.1111/jam.13482.

[27] Kim s, Lee JY, Jeong Y, Kang Ch. Antioxidant activity and probiotic properties of lactic acid bacteria. Fermentation. 2022; 8(1): 2-9. https://doi.org10.3390/fermentation8010029.

[28] Tiantian Hu, Rui Chen, Yu Qian, Ke Ye, Xingyao Long, Kun-Young Park, Xin Zhao, Antioxidant effect of Lactobacillus fermentum HFY02-fermented soy milk on D-galactose induced aging mouse model, Food Science and Human Wellness.2022; pp: 1362-1372.https://doi.org/10.1016/j.fshw.2022.04.0.36.

[29] Somashekaraiah, R., Mottawea, W., Gunduraj, A., Joshi, U., Hammami, R., & Sreenivasa, MY (2021). Probiotic and antifungal attributes of Levilactobacillus brevis MYSN105, isolated from an Indian traditional fermented food pozha. Frontiers in Microbiology, 12, Article 696267.

[30] Yadav, R., Khan, SH, Mada, SB, Meena, S., Kapila, R., and Kapila, S. Consumption of probiotic Lactobacillus fermentum MTCC: 5898-fermented milk attenuates dyslipidemia, oxidative stress, and inflammation in male rats. fed on cholesterol-enriched diet, Probiotics Antimicrob. Proteins. 2019.

[31] Hojjati M, Alizadeh Behbahani B, Falah F. Investigation of technological and antimicrobial characteristics of Lactobacillus bervis gp104 from Khikki cheese. Applied microbiology in food industries. 2021; 7(3): 14-26.

[32] Boricha AA, Shekh SL, Pithva SP, Ambalam PS, Vyas BRM In vitro evaluation of probiotic properties of Lactobacillus species of food and human origin. LWT-Food science and technology. 2019: pp:201-208.

[33] Ebrahimi M, Khomeiri M, Masoud-Nejad A, Sadeghi A, Sadeghi B, Kashaninejad M. Evaluation of the antimicrobial properties of bacteriocin-like substances of Lactobacillus fermentum isolated from Chal. Journal of applied microbiology in food industry. 2018.

[34] Vasiee A, Falah F, Mortazavi SA. Evaluation of probiotic potential of autochthonous lactobacilli strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. Journal of Applied Microbiology. 2022 Nov 1;133(5):3201-14.

[35] Falah F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaee Yazdi F, Mortazavi SA. Optimization of gamma-aminobutyric acid

production by Lactobacillus brevis PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. Food science & nutrition. 2021 Jun;9(6):3317-26.

[36] Falah F, Vasiee A, Tabatabaei-Yazdi F, Moradi S, Sabahi S. Optimization of γ-aminobutyric acid (GABA) production by Lactobacillus spp. from agro-food waste. Biomass Conversion and Biorefinery. 2024 Feb;14(3):3425-37.

[37] Falah F, Zareie Z, Vasiee A, Tabatabaee Yazdi F, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B. Production of synbiotic ice-creams with Lactobacillus brevis PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. Journal of Food Measurement and Characterization. 2021 Dec;15(6):5537-46.

[38] Vasiee A, Falah F, Sankian M, Tabatabaei-Yazdi F, Mortazavi SA. Oral immunotherapy using probiotic ice cream containing recombinant food-grade Lactococcus lactis which inhibited allergic responses in a BALB/c mouse model. Journal of Immunology Research. 2020;2020(1):2635230.

[39] Vasiee AR, Mortazavi A, Tabatabaei-yazdi F, Dovom MR. Detection, identification and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, Iranian fermented cereal product, by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and differentiation using rep-PCR. International Food Research Journal. 2018 Feb 1;25(1).

[40] Behbahani BA, Noshad M, Vasiee A, Brück WM. Probiotic Bacillus strains inhibit growth, biofilm formation, and virulence gene expression of Listeria monocytogenes. LWT. 2024 Jan 1;191:115596.

[41] Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Falah, F., & Vasiee, A. (2020). Gamma-aminobutyric acid production by Lactobacillus brevis A3: Optimization of production, antioxidant potential, cell toxicity, and anti-microbial activity. *Food Science & Nutrition, 8*(10), 5330-5339. doi:https://doi.org/10.1002/fsn3.1838

[42] Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Hojjati, M., & Sheikhjan, M. G. (2024b). Evaluation of probiotic, safety, and anti-pathogenic properties of Levilactobacillus brevis HL6, and its potential application as bio-preservatives in peach juice. *LWT, 191*, 115601.

[43] Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Vasiee, A., & Zeraatpisheh, F. (2023b). Evaluation of anti-yeast metabolites produced by Lactobacillus strains and their potential application as bio-preservatives in traditional yogurt drink. *LWT, 188*, 115428.

[44] Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, anti-microbial activity, and technological performance of Lactobacillus strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science & Nutrition, 9*(8), 4094-4107. doi:https://doi.org/10.1002/fsn3.2365

[45] Falah, F., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Alizadeh Behbahani, B., (2021b). Preparation and Functional Properties of Synbiotic Yogurt Fermented with Lactobacillus brevis PML1 Derived from a Fermented Cereal-Dairy Product. *BioMed Research International, 2021*, 1057531. doi:10.1155/2021/1057531

[46] Kardooni, Z., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., & Noshad, M. (2023a). Probiotic viability, physicochemical, and sensory properties of probiotic orange juice. *Journal of Food Measurement and Characterization, 17*(2), 1817-1822.

[47] Kardooni, Z., Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., & Noshad, M. (2023b). Assessing Protection Mechanisms against Escherichia coli by Analyzing Auto-and Co-Aggregation, Adhesion Ability, Antagonistic Activity and Safety Characteristics of Potentially Probiotic Lactobacillus acidophilus B103. *Nutrition and Food Sciences Research, 10*(1), 11-21.

[48] Mousanejadi, N., Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Jooyandeh, H. (2023). Production and evaluation of a functional fruit beverage consisting of mango juice and probiotic bacteria. *Journal of Food Measurement and Characterization, 17*(4), 3240-3253. doi:10.1007/s11694-023-01862-3

[49] Rouhi A, Falah F, Azghandi M, Alizadeh Behbahani, B., Mortazavi SA, Tabatabaei-Yazdi F, et al. Investigating the effect of Lactiplantibacillus plantarum TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115. LWT. 2024;191:115669. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115669

[50] Zibaei-Rad, A., Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Taki, M. (2023). Assessing the protection mechanisms on Enterobacter aerogenes ATCC 13048 by potentially probiotic strain Lacticaseibacillus casei XN18: An experimental and modeling study. *Microbial Pathogenesis*, *181*, 106177. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2023.106177

[51] Zibaei-Rad, A., Rahmati-Joneidabad, M., Alizadeh Behbahani, B., & Taki, M. (2024). Probiotic-loaded seed mucilage-based edible coatings for fresh pistachio fruit preservation: an experimental and modeling study. *Scientific Reports*, *14*(1), 509.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Isolation and identification of *Limosilactobacillus fermentum* ARD2 strain from local yogurt and evaluation of its probiotic, antimicrobial and safety properties

Behrooz Alizadeh Behbahani*[1], Mohammad Amin Mehrnia[1], Hossein Jooyandeh[2], Fatemeh Matori[3]

1-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
2-Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.
3-PhD. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2024/5/18
Accepted:2024/7/7

Keywords:

Antioxidant activity,

Hemolytic activity,

Common therapeutic antibiotics,

Cell-free supernatant.

DOI: 10.22034/FSCT.21.154.184.

*Corresponding Author E-B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

ABSTRACT

The crucial role of food in life has prompted a shift towards products that not only offer good quality and nutritional properties but also ensure the overall health of consumers. Probiotics, which are non-pathogenic microorganisms, can restore intestinal microbial balance when consumed in sufficient quantities. In this study, Limosilactobacillus fermentum ARD2 isolated from local yogurt was investigated for its probiotic properties. Various aspects of this strain were evaluated, including acid resistance (at pH levels of 2, 3 and 4), resistance to bile salts (at concentrations of 0.3, 0.5 and 0.7 %), antimicrobial activity using disk diffusion agar and well diffusion agar methods, resistance to common therapeutic antibiotics, evaluation of antioxidant activity, cell surface hydrophobicity, DNase enzyme activity, hemolytic activity, and biogenic amine and cholesterol absorption. The results of the acid resistance tests indicated that the viability of L. fermentum ARD2 increased as pH levels rose from 2 to 4, with a decrease observed over time at a constant pH over 3 hours. Growth was inhibited with increasing concentrations of bile salts. Antimicrobial testing revealed that the acidic and neutralized cell-free supernatant (aCFS and nCFS) had no significant antimicrobial effect on Escherichia coli, while nCFS showed no antimicrobial effect on Shigella dysenteriae. L. fermentum ARD2 exhibited resistance to Ciprofloxacin and was semi-sensitive to Penicillin and Nitrofurazone. The L. fermentum ARD2 showed considerable antioxidant activity, with DPPH and ABTS free radical inhibition rates of 41.40% and 43.60%, respectively. Additionally, it demonstrated the ability to reduce cholesterol absorption by 38.60%. The strain tested negative for DNase and hemolytic activities, and biogenic amine production was not observed. Based on these findings, L. fermentum ARD2 exhibits promising probiotic characteristics and could be utilized as a probiotic bacterium in food products.