مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال بیست و یکم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۵، صفحات ۹۸-۸۳

ارزیابی فعالیت‌های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ضدبیوفیلم پست‌بیوتیک *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MG5226 علیه *Escherichia coli* و اثر آن بر رده سلولی Caco-2

بهروز علیزاده بهبهانی[۱]، حسین جوینده[۲]، محمد حجتی[۲]، شقایق اچرش[۳]، زینب موسوی[۳]

۱- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران
پست الکترونیکی: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir

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 کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، ملاثانی، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۶

چکیده

سابقه و هدف: سابقه دیرینه اهمیت مصرف محصولات لبنی به علت وجود فلور میکروارگانیسم‌های مفید و متابولیت‌های آن‌ها و سایر مواد تشکیل دهنده، نقش آن‌ها را در سلامت انسان همواره پررنگ کرده است. هدف از پژوهش حاضر جداسازی و شناسایی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 موجود در ماست محلی به روش مولکولی بود.

مواد و روش‌ها: برای شناسایی مولکولی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226، از پرایمرهای 16s rRNA استفاده شد. آزمون های پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ایمنی سویه شامل: زنده مانی در شرایط اسیدی و صفراوی، آبگریزی، تجمع و هم انباشتگی، قابلیت چسبندگی، ضدچسبندگی، دیسک آگار، چاهک آگار، حداقل غلظت مهارکنندگی، روش اصلاح شده دولایه، کلسترول، آنتی اکسیدانی، تشکیل و تخریب بیوفیلم، فعالیت همولیتیک، تولید DNase، تولید آمین های بیوژنیک و مقاومت آنتی بیوتیک بررسی شد.

یافته‌ها: سویه نسبت به نمک صفراوی و تغییرات pH تحمل نشان داد. علاوه بر این، آبگریزی قابل توجه سطح سلول (۸۰٪/۶۴٪)، خودتجمع (۴۳/۹۰٪) و حذف کلسترول (۴۰/۵۳٪) را نشان داد. سویه فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و حساسیت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را نشان داد. میزان رقابت، مهار و جایگزینی *Escherichia coli* در حضور *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 به ترتیب ۴۶/۵۰٪، ۴۴/۷۰٪ و ۲۶/۸۰٪ بود. سویه فعالیت همولیتیک، تولید آمین های بیوژنیک و DNase نشان نداد.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر، ماست محلی مورد مطالعه قرارگرفت و مشخص شد حاوی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 می‌باشد. این باکتری در کیفیت و مزه ماست محلی مؤثر است لذا می‌توان از آن‌ها به‌عنوان آغازگر در تولید ماست‌های صنعتی نیز بهره برد.

واژگان کلیدی: قدرت آنتی اکسیدانی، پتانسیل پروبیوتیکی، فعالیت ضدمیکروبی، بیوفیلم

پیام‌های اصلی

- باکتری *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MG5226 از ماست محلی جداسازی و با روش مولکولی شناسایی شد.
- سویه تحمل مناسبی در برابر شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی نشان داد که بیانگر پتانسیل پروبیوتیکی آن است.
- سویه دارای فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدبیوفیلم قابل توجه بود.
- عدم مشاهده همولیز، تولید DNase و آمین‌های بیوژنیک، از جنبه ایمنی سویه حمایت می‌کند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

• مقدمه

سابقه دیرینه اهمیت مصرف محصولات لبنی به علت وجود فلور میکروارگانیسم‌های مفید و متابولیت‌های آن‌ها و سایر مواد تشکیل دهنده، نقش آن‌ها در سلامت انسان همواره پررنگ بوده است. امروزه بررسی دانشمندان بیوتکنولوژیست نشان داده است که فرآوردهای تخمیری سنتی سرشار از باکتری‌های مفید می‌باشند. استفاده از این باکتری‌ها و همچنین بررسی منابع و شناخت خواص تکنولوژیکی آن‌ها می‌تواند مشکل صنعت را برای تولید فرآورده‌های سلامت محور آسان‌تر نماید. فرآورده‌های تخمیری و محصولات لبنی به وسیله این باکتری‌ها طی فرآیند تخمیر موادی را تولید می‌نمایند. متابولیت این میکروارگانیسم‌های زنده، موادی چون اسیدهای آلی، دی استیل، پراکسید هیدروژن، ترکیبات ضدقارچی و باکتریوسین می‌باشد. این در حالی است که این مواد می‌توانند ترکیبات پروتئینی با خاصیت ضدمیکروبی باشند که باعث جلوگیری از رشد سویه‌های حساس شوند (۱). لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های گرم‌مثبت، بی‌حرکت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، احیا نیترات منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که قادر بـه ذوب ژلاتین و تولیـد ایندول نیستند. در حال حاضر بیش از صد گونه از این جنس شناسایی شده است (۲،۳). جنس لاکتوباسیلوس بزرگ‌ترین جنس در گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هتروژن است. لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های میله‌ای شکل به طول ۱۰-۱ و عرض ۱/۲-۰/۵ میکرون هستند. این باکتری‌ها با این‌که فاقد کاتالاز و سیتوکروم اکسیداز هستند، ولـی در مجـاورت اکسیژن هوا رشد مـی‌کننـد و میکروآئروفیـل بـوده، در حضور هوا رشد کمی دارند و وجود ۵٪ دی اکسـیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آن‌ها می‌شود. سویه های لاکتوباسیلوس باعث تقویت سد مخاطی روده شده که این امر موجب حفظ و ارتقاء سطح ایمنی می‌شود. همچنین سبب کاهش میزان بیماری‌های التهابی روده و سندرم روده تحریک پذیر می‌شود (۴). در طی تخمیر لاکتیکی باکتریوسین‌ها ترکیبات پروتئینی با توانایی بازدارندگی رشد باکتری‌های بیماری‌زا حساس و سیستم تخریب متفاوت در دستگاه گوارش در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. ترکیبات ضدمیکروبی نیز از آن‌ها برای رقابت و مهار میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا تهیه می‌شود (۵). چنین ترکیباتی ممکن است متابولیسم یا سموم باکتری‌های بیماری‌زا را تحت تاثیر قرار دهند (۶،۷).

Lactobacillus delbrueckii شامل شش زیرگونه به نام‌های *delbrueckii*، *lactis*، *bulgaricus*، *indicus*، *jakobsenii* و *sunkii* است که همگی بر اساس توانایی‌شان در متابولیسم کربوهیدرات‌های مختلف متمایز شده‌اند (۸). *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 یکی از اجزای کشت اولیه برای تولید ماست است (۸،۹). این زیرگونه خواص پروبیوتیکی را نشان می‌دهد (۱۰). از مزایای زیرگونه *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 با قابلیت متابولیسم کربوهیدرات گسترده‌اش می‌باشد (۱۱). *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 ، *jakobsenii* و *sunkii* زیرگونه‌های نسبتاً کوچکی هستند که به ترتیب از محصولات لبنی هندی، نوشیدنی‌های الکلی تخمیرشده و ترشی بدون نمک به عنوان یک غذای سنتی ژاپنی جدا شده‌اند (۱۲،۱۵).

در سال‌های اخیر سویه‌های بومی لاکتوباسیل‌ها از جمله *Lactobacillus delbrueckii* به دلیل ویژگی‌هایی هم‌چون مقاومت ذاتی به فاژهای مخرب، خاصیت ضدمیکروبی و توانایی در تولید طعم و بوی مطلوب در تهیه انواع غذاها و فرآورده های تخمیری مورد توجه قرار گرفته اند (۱۶). لذا آگاهی از فلور باکتری‌های اسیدلاکتیکی موجود در ماست‌های محلی امکان تهیه آغازگر برای تولید محصولات صنعتی سالم‌تر، استاندارد و با طعم بهتر را فراهم می کند (۱۷). در همین راستا مطالعه‌های گسترده‌ایی برای شناسایی این باکتری‌ها در محصولات غذایی مختلف صورت گرفته است. در آفریقای جنوبی محصولات لبنی سنتی مورد بررسی قرار گرفتند و *Lactobacillus delbrueckii* در آن‌ها شناسایی شدند (۱۸). در سال ۲۰۰۵ از ماست سنتی، *Lactobacillus delbrueckii* جداسازی شد (۱۹). در ایران به منظور تهیه محصولات با کیفیت بالاتر مطالعه‌هایی بر روی لاکتوباسیلوس‌ها صورت گرفته است. گروهی از محققین *Lactobacillus casei, plantarum* و *Lactobacillus*

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

Lactobacillus pentasus را از پنیر شناسایی کردند (۲۰،۲۱). همچنین فلاح و همکاران در سال‌های ۲۰۲۰ و ۲۰۲۱ و ۲۰۲۲ مطالعاتی در زمینه لاکتوباسیلوس انجام دادند (۲۶-۲۲)، ولی از ماست محلی مطالعات کمی در ایران برای *Lactobacillus delbrueckii* صورت گرفته است. هدف از تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 موجود در ماست محلی به روش مولکولی است.

• مواد و روش‌ها

مواد

مواد شیمیایی مورد استفاده از درجه آنالیتیکی بوده و از شرکت سیگما آلدریچ (ایالات متحده آمریکا) یا شرکت مرک (آلمان) خریداری شده است. هفت آنتی‌بیوتیک رایج، مانند آمپی‌سیلین (۱۰میکروگرم در میلی‌لیتر)، اریترومایسین (۱۵میکروگرم در میلی‌لیتر)، ایمی‌پنم (۱۰میکروگرم در میلی-لیتر)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، نالیدیکسیک (۳۰میکروگرم در میلی‌لیتر)، نیتروفورانتوئین (۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) از شرکت پادتان طب (ایران) خریداری شد.

جداسازی لاکتوباسیلوس با استفاده محیط کشت اختصاصی

به منظور فعال‌شدن، باکتری لیوفیل‌شده به محیط کشت MRS Brothمنتقل شد و در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت حرارت داده شد. میکروارگانیسم‌های فعال شده به محیط کشت MRS Agar منتقل و در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. این محیط کشت به عنوان محیط نگهداری برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرارگرفت. خلوص سویه مورد نظر با رنگ‌آمیزی مورد بررسی قرارگرفت.

انجام آزمون‌های تاییدی: آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی از قبیل احیا نیترات، ذوب ژلاتین، تولید اندول از تریپتوفان و آزمایش کاتالاز برای تشخیص باکتری‌های اسید لاکتیک بر روی سویه‌های جداشده انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های مشکوک به *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226

: در این مطالعه آزمایشگاهی، جداسازی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 از ماست محلی انجام شد. برای شناسایی باکتری به روش مولکولی، استخراج DNA با کیت EZ-10 SPIN COLUMN GENOMIC DNA (بیوبیسیک، کانادا) صورت گرفت و غلظت و خلوص نمونه‌های استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر بررسی گردید. سپس با استفاده از پرایمرهای ناحیه 16s rRNA (تکاپوزیست، ایران) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز انجام شد. محصول PCR با استفاده از ژل اگارز ۱/۵٪ درکنار DNA مارکر kb ۱(سیناژن، ایران) مطالعه شد و نمونه-های دارای باند ۱۵۰۰bp جهت تعیین توالی به شرکت پویا ژن گستر جهت تعیین توالی ارسال شدند.

آنالیز نتایج تعیین توالی: DNA کروموزومی از سویه استخراج شد و با استفاده از جذب نوری DNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و بررسی نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰، غلظت و خلوص DNA استخراج شده بررسی شد. نمونه‌های دارای غلظت و خلوص مناسب جهت ادامه کار انتخاب شدند. سپس واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ۱۶s rRNA صورت گرفت و باندهای bp ۱۵۰۰ در نمونه‌ها مشاهده شد. محصول PCR حاصل شده، تعیین توالی شد و توالی‌های به‌دست‌آمده در سایت NCBI بررسی و بلاست شدند. باکتری‌های جدا شده ۹۹٪ تشابه نوکلئوتیدی را با *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226داشتند.

مقاومت نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده گوارشی

ارزیابی مقاومت لاکتوباسیل‌های جدا شده نسبت به شرایط معده‌ای طبق روش بومر و همکاران (۱۹۹۲)، با اندکی تغییر انجام گرفت (۳۱). محیط شبیه‌سازی شده شیره معدی با pH=3، با اضافه نمودن پپسین (۳ میلی‌گرم بر لیتر)، صفرا (۰/۰۵ میلی‌گرم بر لیتر)، لیزوزیم (۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر) و ۰/۵٪ کلرید سدیم آماده شد. به میزان ۱٪ حجمی/حجمی از سوسپانسیون باکتریایی جدایه‌ها با رقت نیم مک فارلند به محیط شیره معده افزوده شد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. زنده مانی باکتری‌های جدا شده بعد از ۴،۱۴، ۲۴ و ۳۴ دقیقه به روش پورپلیت بررسی شد.

مقاومت به pH

برای تعیین شرایط اسیدی، جدایه *لاکتوباسیلوس* در محیط کشت MRS به مدت ۱۸ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از تهیه محیط MRS جدید با pHهای ۲، ۳

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

و ۴ جدایه‌ها به این محیط اضافه و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس نتایج کشت نسبت به کدورت نیم مک فارلند بررسی شد (۲۷).

مقاومت به نمک‌های صفراوی

محیط کشت MRS Broth به عنوان کنترل و MRS Broth دارای ۰/۳٪ املاح صفراوی به‌عنوان تیمار به‌طور هم‌زمان با ۱٪ از کشت باکتریایی فعال ۲۴ ساعته تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ ساعت انکوبه شدند. منحنی‌های رشد بر اساس جذب نوری برای هر ایزوله رسم و بر اساس اختلاف در جذب‌های نوری متوالی بین غلظت‌های مختلف و زمان به عنوان تأخیر در رشد در نتیجه اثر بازدارندگی نمک‌های صفراوی انجام شد (۲۷).

اندازه‌گیری میزان آبگریزی

اندازه‌گیری میزان آبگریزی هیدروفوبیستی یا آبگریزی جدایه *لاکتوباسیلوس* مورد نظر با استفاده از xylene با اندکی تغییرات انجام شد (۳۲). رسوب باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه از کشت شبانه بدست آمد. سپس رسوب بدست آمده به وسیله‌ی بافر فسفات پتاسیم با pH ۱/۵ شستشو و پس از انحلال مجدد در ۵ میلی-لیتر از همین بافر، جذب آن در A620 نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از اضافه کردن ۱ میلی‌لیتر xylene به محلول، به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد تا فازها از هم جدا شوند. سپس فاز آبی رویی را جدا کرده و جذب آن در A620 نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد آبگریزی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$$H\% = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

H درصد آبگریزی، A_0 جذب نوری قبل از محلول کردن، A_1 جذب نوری بعد از محلول کردن

بررسی تجمع و هم‌انباشتگی

بررسی تجمع: این کار با استفاده از روش کردونی و همکاران (۲۰۲۳) با سانتریفیوژ کردن کشت یک شبه (۱۰ دقیقه در۶۰۰۰ دور در دقیقه) با استفاده از بافر فسفات سرد برای شستشو و لیز انجام شد و جذب ۰/۶ در ۶۰۰ نانومتر (A0) به دست آمد. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و چگالی نوری (A1) سوسپانسیون باکتریایی اندازه‌گیری شد. برای محاسبه تجمع از معادله زیر استفاده شده است (۳۴).

$$\text{تجمع خودکار} \% = (A_0 - A_1/A_0) \times ۱۰۰$$

بررسی هم‌انباشتگی: روش هم‌انباشتگی با استفاده از روش کردونی و همکاران (۲۰۲۳) با تعیین میزان جذب سوسپانسیون‌های جداگانه *لاکتوباسیلوس* و باکتری‌های بیماری‌زا (AS) در طول موج ۶۰۰ نانومتر به کار گرفته شد. سوسپانسیون‌ها ترکیب شدند و به مدت ۳۰ ثانیه هم‌زده شدند، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرارگرفتند. سپس جذب مخلوط در ۶۰۰ نانومتر (AM) اندازه‌گیری شد تا هم‌انباشتگی محاسبه شود (۳۴).

$$\text{هم‌انباشتگی} \% = (۱- (\frac{AM}{AL+As/۲})) \times ۱۰۰$$

تعیین قابلیت چسبندگی

رده سلول‌های Caco-2، از آزمایشگاه کشت سلول خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۱۰٪ (حجمی/حجمی) سرم جنین گاوی غیرفعال شده با حرارت و مخلوط استاندارد از آنتی‌بیوتیک‌ها (استرپتومایسین و پنی سیلین) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت فشار ۵٪ دی اکسید کربن رشد داده شد. رشد سلول‌ها در فلاسک‌های کشت سلولی به مدت یک هفته ادامه داشت و یک روز در میان محیط کشت آن تعویض شد. آزمون چسبندگی در پلیت ۶ چاهکی با ۲۵۰۰۰۰ سلول در هر میلی‌لیتر انجام شد. پس از تشکیل یک لایه نازک از سلول در کف پلیت، جهت حذف آنتی‌بیوتیک دوبار با محلول نمکی بافر فسفات شست و شو داده شد و یک میلی-لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصل از کشت ۱۸ ساعته سویه-ها با غلظتی معادل نیم مک فارلند به سلول های Caco-2 اضافه و به مدت ۲ ساعت تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ دی اکسید کربن گرمخانه گذاری شد. توانایی چسبندگی باکتری بر اساس تعداد باکتری‌های چسبیده نسبت به تعداد کل باکتری اولیه گزارش شد (۳۱).

خاصیت ضدچسبندگی سلول

ارزیابی رقابت، بازداری و جایگزینی به منظور بررسی پتانسیل ضدچسبندگی انجام شد. مقادیر مساوی از باکتری‌ها به چاهک‌ها اضافه شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت در شرایط محیطی ۵ به ۹۵ درصد از CO2 و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

رطوبت ثابت، گرمخانه گذاری شدند. از بافر فسفات استریل برای شستشوی باکتری‌های آزاد و ۰/۰۵٪ از تریتون ۱۰۰- X برای جدا کردن باکتری‌های چسبیده استفاده شد. برای تشخیص پاتوژن‌ها، محیط‌های انتخابی استفاده شد. برای ارزیابی توانایی جدایه‌ها در مهار چسبندگی از روش مهاری استفاده شد. ارزیابی رقابت، بازداری و جایگزینی مطابق مطالعه کردونی و همکاران (۲۰۲۳) انجام شد (۳۴).

پتانسیل ضدمیکروبی

برای آماده‌سازی عصاره باکتری برای خواص ضدمیکروبی، ابتدا عصاره تیمار بهینه برای حذف سلول‌های باکتریایی فیلتر شد و به مدت ۲۰ دقیقه و ۲۸۰۰ گرم در دمای ۵ درجه سانتی-گراد سانتریفیوژ شد و مایع‌رویی از کاغذ صافی ۰/۲۲ میکرومتر عبور کرد و با استفاده از هیدروکسید سدیم به pH 7 رسید. در نهایت با یک BETA LCS به علاوه ۲-۸ یخ خشک در دمای انجماد ۴۵- درجه سانتی‌گراد لیوفیلیز شد و به مدت ۴۰ ساعت تا دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد تحت خلاء ۰/۳۸ میلی بار گرم شد. نمونه خشک شده مجدداً با ۴ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل شد و خواص ضدمیکروبی آن با حداقل غلظت بازدارنده به روش دیسک در آگار چاهک در آگار بررسی شد. سویه‌های بیماری‌زا مورد استفاده در این آزمایش شامل *E. coli, Shigella dysentery, Klebsiella aerogenes, Bacillus subtilis, Streptococcus pyogenes* و *Listeria monocytogenes* بودند. در این مطالعه آنتی بیوتیک‌های ایمی-پنم (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آمپی‌سیلین (۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، اریترومایسین (۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، سیپروفلوکساسین (۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، نالیدیکسیک اسید (۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، نیتروفورانتوئین (۱۰ میلی-گرم بر میلی‌لیتر) و کلرامفنیکل استفاده شد. این آزمایش ابتدا عصاره تخمیر شده در پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS Agar کشت داده شد و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی با غلظت مشخص در فاصله ۲ تا ۴ سانتی‌متری قرار داده شد. سپس آن‌ها را به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق ثابت کرده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. در پایان انکوباسیون قطر ناحیه شفاف اطراف دیسک اندازه‌گیری شد و بر اساس معیارهای استاندارد، مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی شد. محیط MRS Agar برای رشد کنترل مثبت استفاده شد.

اثر ضدمیکروبی از طریق روش اصلاح شده دو لایه

ابتدا باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS Broth (مرک آلمان) Ph=6/5 تحت شرایط استریل کشت داده شدند و پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی، ۵۰ میلی‌لیتر از هر پروبیوتیک در وسط پلیت حاوی محیط MRS Agar (مرک آلمان) ریخته و اجازه داده شد تا رطوبت حاصل از مایع میکروبی کاملا جذب محیط شود و مجددا پلیت‌های MRS Agar به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در جار بی‌هوازی گرماگذاری شدند. سپس محیط MHA (مرک آلمان) مذاب بر روی محیط MRS Agar (مرک آلمان) حاوی پروبیوتیک ریخته و اجازه داده شد تا کاملا محیط ببندد. سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از کشت شبانه باکتری‌های بیماری‌زا تهیه و به صورت متراکم بر روی محیط MHA کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری و سپس از نظر قطر هاله عدم رشد بررسی شدند. آزمایش برای هر باکتری سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا در حضور باکتری‌های پروبیوتیک گزارش گردید (۳۳).

میزان حذف کلسترول

عصاره در محیط MRS با ۰/۳٪ نمک صفراوی اگزالات و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر کلسترول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۸ ساعت کشت داده شد. عصاره تخمیر باکتری در ۴۰۳۲ گرم به مدت ۸ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. ۰/۵ میلی‌لیتر مایع رویی به ۳ میلی-لیتر اتانول ۹۵٪ و ۲ میلی‌لیتر KOH ۵۰٪ اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در حمام بخار مخلوط و حرارت داده شد. سپس ۵ میلی‌لیتر هگزان و ۳ میلی-لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شد تا فاز مخلوط دو برابر شود. تبخیر با استفاده از ۲ میلی‌لیتر هگزان در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. ۲ میلی‌لیتر معرف O-phthalaldehyde اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ نیز اضافه و مخلوط شد. پس از ۱۰

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

دقیقه، سرعت جذب در ۵۵۰ نانومتر خوانده شد. برای تعیین غلظت کلسترول از منحنی استاندارد استفاده شد.

خواص آنتی‌اکسیدانی

آنتی‌اکسیدانت‌ها به عنوان اصلی‌ترین راه مبارزه با رادیکال‌های آزاد و بازسازی سلول‌های تخریب شده شناخته می‌شوند چرا که موجب افزایش کارایی دستگاه ایمنی بدن در برابر انواع بیماری‌ها می‌شوند. آنتی‌اکسیدانت‌ها خطر گسترش بیماری آلزایمر را کاهش می‌دهند. استرس اکسیداتیو چیرگی رادیکال‌های آزاد بر دفاع آنتی‌اکسیدانتی بدن است. فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از دو روش ازمون ABTS و فعالیت مهار رادیکال DPPH بررسی شد.

آزمون DPPH: به منظور ارزیابی فعالیت بهینه مهار رادیکال آزاد، ۲ میلی‌لیتر از نمونه با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH، ۰/۲ میلی‌مول در اتانول ۹۵٪ مخلوط شد. پس از نگهداری نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در یک مکان تاریک، جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر ثبت شد. محلول اتانول BHT با غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها استفاده شد.

$$DPPH^{\cdot}\ (purple) + H - A \rightarrow DPPHH\ (yellow) + A^{\cdot}$$

آزمون ABTS : آزمون ABTS مطابق با روش آرناو و همکاران با اندکی تغییر انجام شد. محلول‌های پایه ABTS (۷/۴ میلی-مولار) و پتاسیم پرسولفات (۲/۶ میلی‌مولار) تهیه شد و در ادامه محلول ABTS اصلی بوسیله‌ی مخلوط کردن دو محلول پایه به مقدار مساوی با یکدیگر تهیه شده و در ادامه این مخلوط در دمای اتاق و محیط تاریک به مدت ۱۶ ساعت به منظور تکمیل واکنش نگهداری شد. سپس محلول تهیه شده با متانول تا رسیدن جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۰/۲ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید و عصاره‌ها به ۴ میلی‌لیتر از محلول تازه تهیه شده‌ی ABTS اضافه شد و به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگهداری گردید. سپس جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از منحنی درجه بندی اسید آسکوربیک نتایج بر حسب معادل گرم آسکوربیک اسید بر گرم فنولیک نمونه بیان گردید (۳۶).

درصد مهار فعالیت هیدروژن پراکسید= {۱-(جذب نمونه/جذب شاهد)}×۱۰۰

تشکیل و تخریب بیوفیلم

مهار و تخریب بیوفیلم با استفاده از روش کریستال ویولت ارزیابی شد.

تحت یک فرآیند رقت دو برابری متوالی قرار گرفت که از ۱۰۰٪ تا ۰/۷۸٪ متغیر بود. کشت‌های باکتریایی نیز تا 10^{6} CFU/mL رقیق شدند. در یک صفحه ۹۶ چاهی، ۵۰ میکرولیتر CFS و ۵۰ میکرولیتر کشت باکتریایی به هر چاهک اضافه شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، سوسپانسیون‌های سلولی دور ریخته شدند و چاه‌ها با آب شسته شدند. محلول کریستال ویولت (۱٪) برای رنگ‌آمیزی اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه محلول رنگ‌آمیزی استخراج شد. OD در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از میکروپلیت خوان اندازه‌گیری شد.

برای ارزیابی تأثیر CFS بر تخریب بیوفیلم بالغ، یک سوسپانسیون باکتریایی (10^{6}CFU/mL) ایجاد و ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک میکروتیتر ۹۶ چاهی اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، سوسپانسیون‌های سلولی خارج شدند. CFS، رقیق شده در افزایش دو برابری (۱۰۰٪-۰/۷۸٪)، (۱۰۰ میکرولیتر) به هر چاه اضافه شد. برای هر سویه، یک گروه کنترل با استفاده از TSB به جای CFS تهیه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون اضافی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، صفحات دو بار شستشو داده شدند تا بیوفیلم‌های باقی‌مانده حذف شوند. بیوفیلم‌های باقی‌مانده با استفاده از روش ذکر شده قبلی اندازه‌گیری شدند. سرعت تشکیل بیوفیلم بر این اساس تعیین شد:

$$\text{درصد تشکیل بیوفیلم} = \left(\frac{OD_{\text{کنترل}}}{OD_{\text{تیمار}}}\right) \times ۱۰۰$$

ارزیابی ایمنی

فعالیت همولیتیک: فعالیت همولیتیک عصاره به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت بلاد آگار (۷ درصد وزنی/ وزن خون گوسفند) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. اگر رنگ سبز ظاهر شود که آلفا همولیز است، اگر تغییری نداشته باشد گاما همولیز است که فاقد خاصیت همولیتیک در نظر گرفته می شود. اگر یک ناحیه شفاف در اطراف کلنی مشاهده شد، به عنوان بتا همولیز طبقه‌بندی می شود (۳۵).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

تولید DNase: همچنین به منظور بررسی تولید آنزیم DNase، سویه در محیط کشت DNase کشت داده شد. پس از انکوباسیون پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، کلنی‌های صورتی شفاف نشان‌دهنده تولید DNase هستند (علیزاده بهبهانی و همکاران، ۲۰۲۳).

تولید آمین‌های بیوژنیک: از روش برزگر و همکاران (۲۰۲۱) با اندکی تغییرات جهت بررسی توانایی باکتری‌های لاکتیک اسید در تولید آمین‌های بیوژنیک استفاده شد. ابتدا هر یک از سویه‌های میکروبی به مدت ۲۴ ساعت در محیط MRS Brothحاوی ۰/۵٪ از هر یک از پیش‌سازهای اسیدهای آمینه شامل L- تیروزین، L- هیستیدین و L-اورنیتین فعال گردید. سپس، سویه‌ها بر روی محیط MRS Agar حاوی پیش‌سازها و ۰/۰۵٪ بروموکروزول بنفش کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. حضور رنگ بنفش در اطراف کلنی‌ها به عنوان توانایی تولید آمین‌بیوژنیک در نظر گرفته شد (۳۸).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک: مقاومت به آنتی‌بیوتیک طبق روش کبسی و گوراکان (۲۰۰۳) انجام شد (۳۹). بدین ترتیب که، پلیت‌های حاوی محیط MRS Agar، با ۴ میلی‌لیتر MRS نیمه جامد (۰/۸٪ آگار) حاوی ۲۰۰ میکرولیتر باکتری پوشانده شد. پس از نیم ساعت، دیسک‌ها روی محیط قرار داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. مناطق بازدارنده اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شد و هاله‌هایی با قطر کمتر از ۱۵ میلی‌متر به عنوان باکتری‌های مقاوم، هاله‌هایی با قطر ۲۰-۱۶ میلی‌متر به عنوان باکتری‌های نیمه حساس و هاله-هایی با قطر بیشتر از ۲۱ میلی‌متر به عنوان باکتری‌های حساس تعیین شدند (۳۸).

آنالیز آماری

تجزیه تحلیل آماری نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای آزمون اختلاف میانگین در چند گروه کیفی از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA استفاده شد. میزان معنی‌داری از آزمون Tukey Hoc Post استفاده شد.

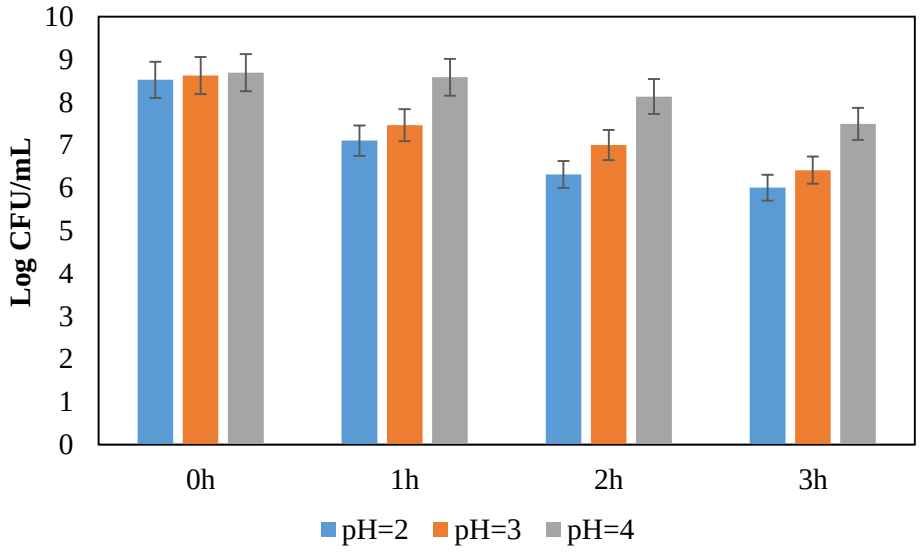
• یافته‌ها

مقاومت نسبت به شرایط گوارشی

عبور پروبیوتیک‌ها از دستگاه گوارش با چالش‌های فراوانی روبه‌رو است؛ آنزیم لیزوزیم موجود در بزاق به عنوان اولین سد دفاعی بدن، یک پروتئین ضدمیکروبی است که با فعالیت هیدرولازی باعث از هم‌گسیختگی دیواره سلولی باکتری‌ها می شود. بعد از گذشت ۱ ساعت درصد زنده‌مانی برابر با ۰/۴۳ ± ۶/۳۸ بود.

مقاومت در برابر pH

همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، با افزایش زمان، مقاومت و زنده‌مانی سویه کاهش می‌یابد و در pH=۴ در بازه زمانی مختلف میزان بقای قابل توجهی دارد.



شکل ۱. توانایی زنده مانی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 در شرایط اسیدی.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

غلظت نمک‌های صفراوی

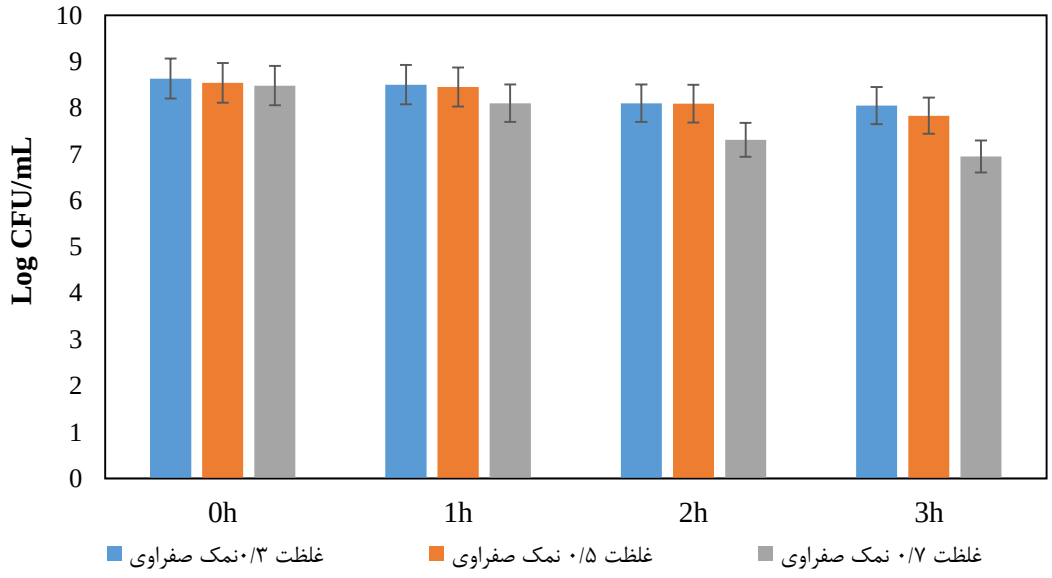
همان طور که در شکل۲ قابل مشاهده است، با افزایش زمان و غلظت نمک‌های صفراوی، میزان بقای سویه کاهش یافته و در غلظت ۰/۵٪ نمک صفراوی، میزان بقای بالایی دارد.

خواص سطحی سلولی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226

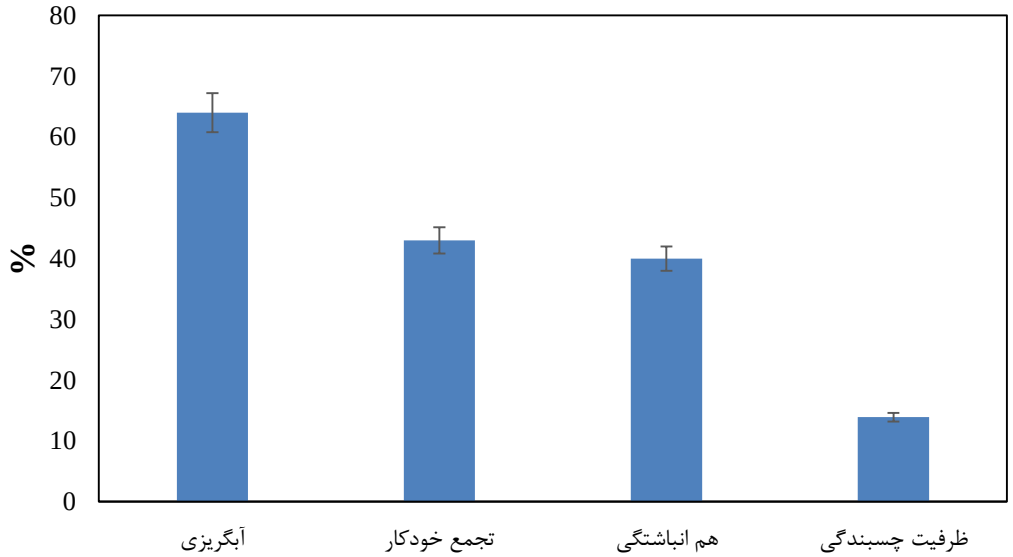
هیدروفوبیستی سطحی سلول شاخصی از تمایل باکتری جهت اتصال به حلال‌های غیرقطبی است. خودتجمعی روی چسبندگی باکتری‌های پروبیوتیک به سلول‌های روده تاثیر می گذارد. هم‌تجمعی با باکتری‌های پاتوژن هم بر روی مکانیسم آنتاگونیسمی باکتری‌های پروبیوتیک که می‌توانند مانع اتصال سویه‌های بیماری‌زا به سلول‌های روده شوند، اثر می‌گذارد

خاصیت ضدچسبندگی سلول

میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا برای ایجاد بیماری باید به سطوح مخاطی بچسبند یا به آن‌ها نفوذ کنند. درصد رقابت، بازداری و جایگزینی E. coli در حضور *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 به ترتیب ۴۶/۵۰، ۴۴/۷۰ و ۲۶/۸۰ درصد بود.



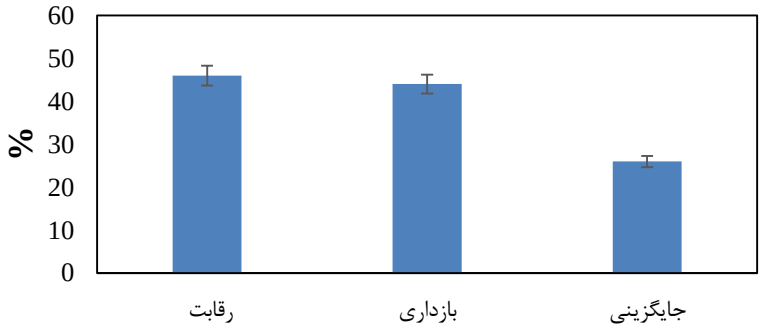
شکل ۲. توانایی زنده مانی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 در غلظت‌های مختلف نمک صفراوی.



شکل ۳. خواص سطح سلولی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226.

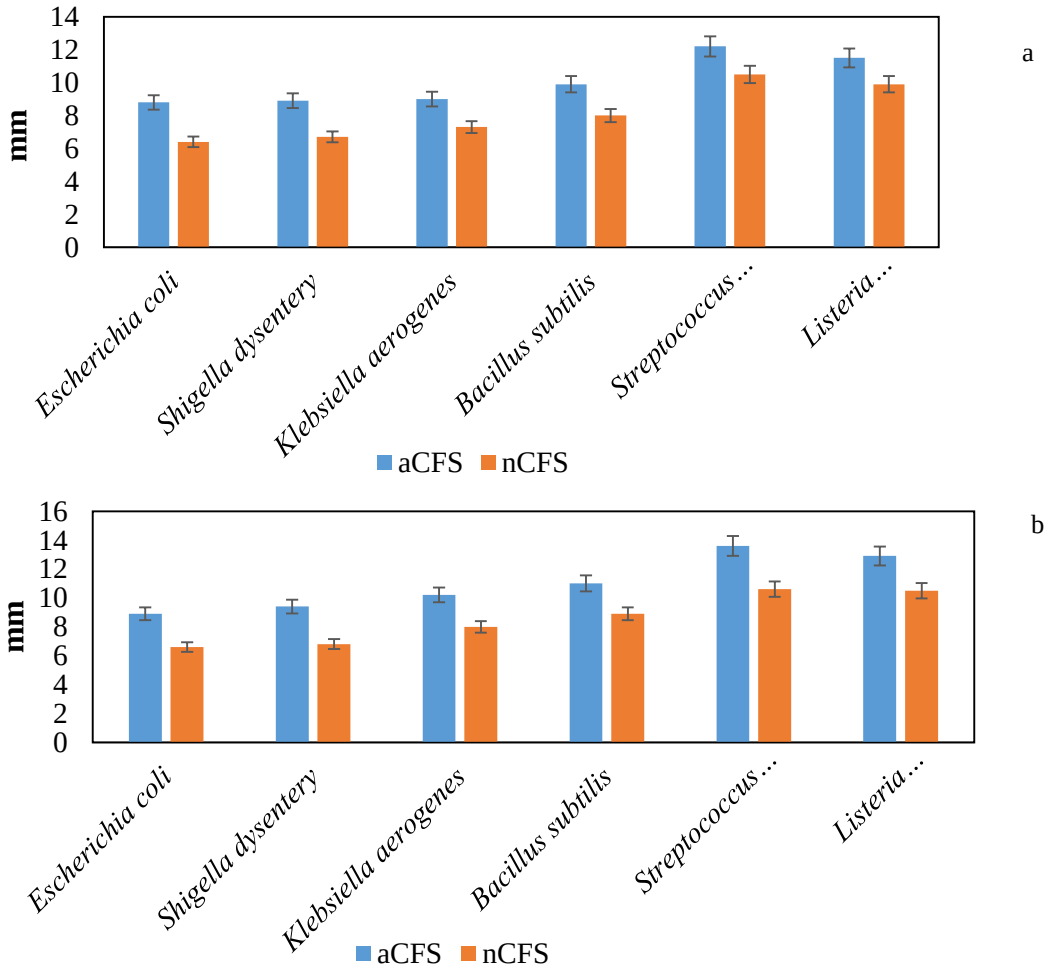
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]



شکل۴. نتایج خاصیت ضدچسبندگی (رقابت، بازداری و جایگزینی) *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226

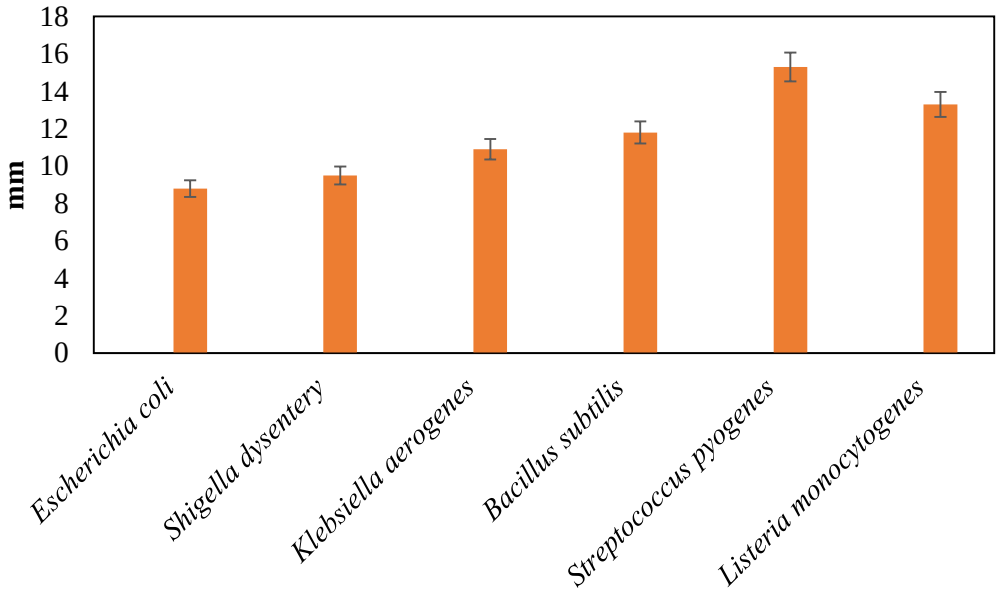
اثر ضدمیکروبی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 در برابر باکتری‌های بیماری‌زا، از طریق روش دیسک دیفیوژن آگار، چاه دیفیوژن آگار و روش اصلاح-شده دو لایه: یکی از جنبه‌های مهم فعالیت باکتری پروبیوتیک، حفاظت از ریزمحیط دستگاه گوارش در برابر عوامل بیماری‌زا است. در این پژوهش aCFS فعالیت ضدباکتریایی بالاتری را نسبت به nCFS در هر دو روش دیسک و چاهک نشان داد. همچنین *Streptococcus pyogenes* در هر دو روش بیشترین حساسیت به سویه پروبیوتیک و E. coli کمترین حساسیت را نشان داد.



شکل ۵. اثر ضدمیکروبی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 در برابر باکتری‌های بیماری‌زا بر اساس دو روش دیسک دیفیوژن آگار(a) و چاهک دیفیوژن آگار (b). aCFS و nCFS به ترتیب به سوپرناتانت‌های بدون سلول اسید و سوپرناتانت بدون سلول خنثی شده اشاره دارد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]



شکل ۶. اثر ضدمیکروبی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 در برابر باکتری‌های بیماری‌زا از طریق روش اصلاح شده دولایه

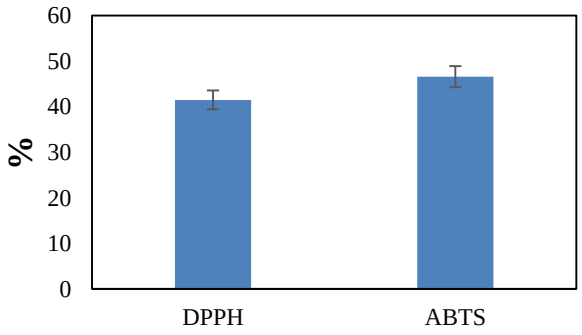
حذف کلسترول

توانایی لاکتوباسیلوس‌ها برای حذف کلسترول از محیط را می‌توان به مکانیسم‌های مختلفی نسبت داد. این‌ها شامل جذب، هیدرولیز آنزیمی نمک‌های صفراوی مزدوج و رسوب همزمان کلسترول با نمک‌های صفراوی دکونژوگه است (برزگر و همکاران، ۲۰۲۳). در مطالعه حاضر میزان کاهش کلسترول سویه *L.delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226، ۴۰/۵۳٪ بود.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مطالعات اخیر نشان داده‌اند که پروبیوتیک‌ها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند که به انواع فواید سلامتی مانند کاهش دیابت، بیماری‌های قلبی عروقی و التهاب روده کمک می‌کنند. فعالیت‌های *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 مهار رادیکال DPPH و ABTS قابل توجه به ترتیب ۴۱/۴۹ و ۴۶/۶۰ درصد را نشان داد.

شکل ۸ نتایج سرعت تشکیل بیوفیلم در مرحله اولیه تشکیل بیوفیلم توسط *E. coli* تیمارشده با مایع رویی بدون سلول *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 را نشان می‌دهد.



شکل ۷. فعالیت آنتی اکسیدانی *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226

بررسی بیوفیلم

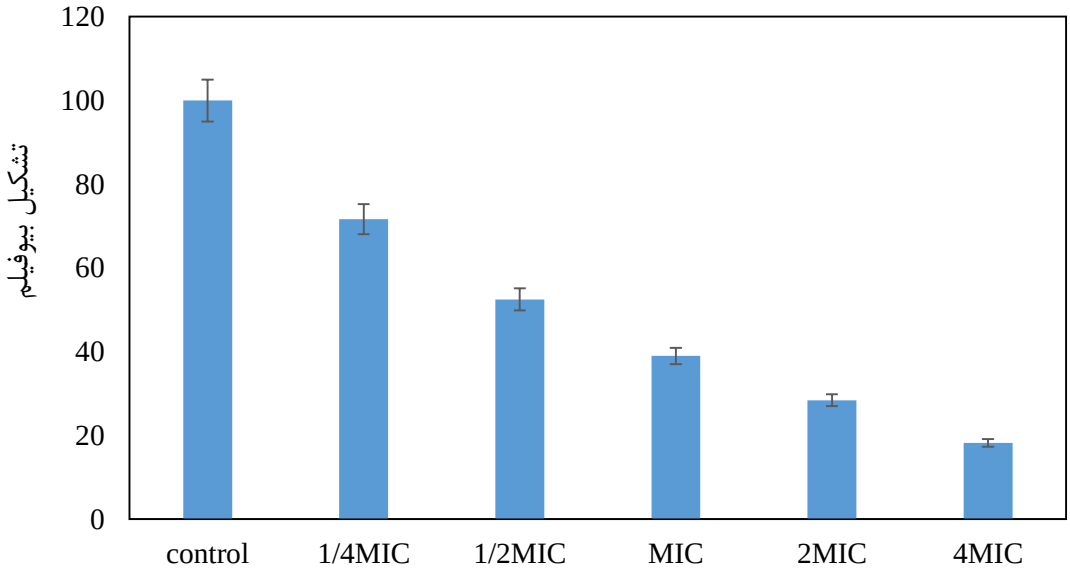
شکل ۹ نتایج فعالیت تخریب بیوفیلم مایع رویی بدون سلول *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 (CFS) بر روی بیوفیلم‌های بالغ *E. coli* را نشان می‌دهد.

ارزیابی ایمنی

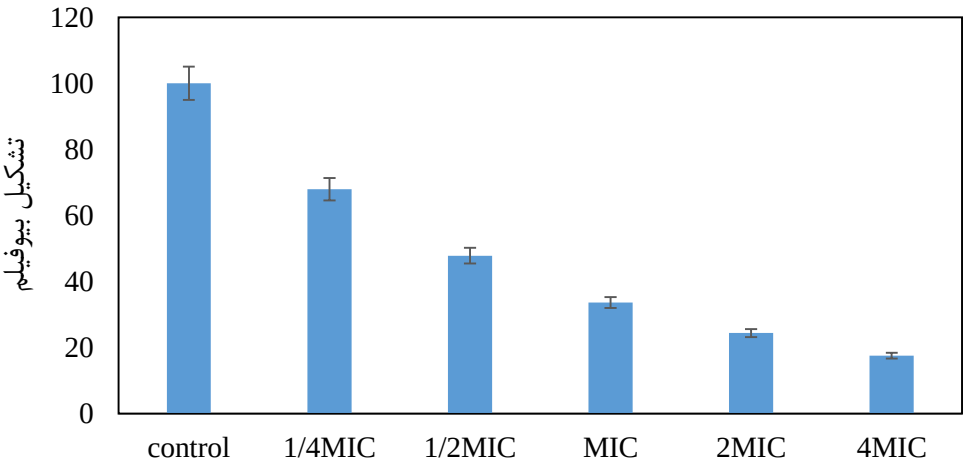
خواص همولیتیک، DNase و تولید آمین‌بیوژنیک در *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 مشاهده نشد. نسبت به ایمی‌پنم، اریترومایسین، سیپروفلوکساسین، نالیدیکسیک‌اسید، نیتروفورانتوئین و کلرامفنیکل حساس و نسبت به آمپی سیلین نیمه حساس بود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

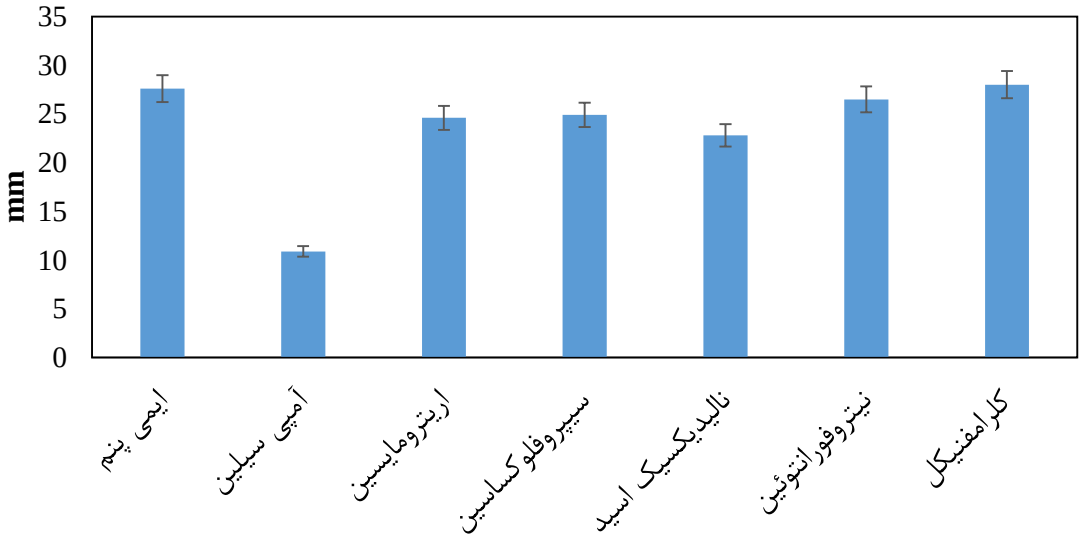
[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]



شکل ۸. فعالیت ضد بیوفیلمی مایع رویی بدون سلول باکتری*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 علیه توانایی تشکیل بیوفیلم *Escherichia coli*.



شکل ۹. فعالیت ضد بیوفیلمی مایع رویی بدون سلول باکتری*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 علیه توانایی تخریب بیوفیلم *Escherichia coli*.



شکل ۱۰. اثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج درمانی بر *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

• بحث

باکتری‌های لاکتیکی به‌طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده‌اند و به‌عنوان فلور غالب در شیر و فرآورده‌های آن محسوب می‌شوند. مطالعه‌های مختلف تأثیر لاکتوباسیل‌ها بر خواص حسی و فیزیکی پنیرهای سنتی را نشان می‌دهد لذا استفاده از آن‌ها به‌عنوان آغازگر یا کمک آغازگر در تولید ماست اهمیت پیدا کرده و در سال‌های اخیر مطالعه خصوصیت‌های آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. از آنجا که لاکتوباسیل‌ها در ماست به تعداد زیاد یافت می‌شوند، این باکتری‌ها نقش عمده‌ای را در رسیدن ماست از طریق فعالیت‌های بیوشیمیایی‌شان ایفا می‌کنند. امروزه استفاده از روش‌های فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی در شناسایی لاکتوباسیل‌ها بسیار رایج است ولی آنچه مسلم است این تست‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند و گاه در بین تعداد زیادی جدایه، خصوصیت‌های فیزیولوژیکی مشابه‌ای دیده می‌شود. به‌علاوه نتایج این روش‌ها همیشه دقیق نیست. لذا از روش‌های ژنتیکی و تعیین توالی جهت شناسایی سوش‌های لاکتوباسیل‌ها و تنوع میکروبی موجود در محصولات لبنی استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر سویه از نمونه‌های ماست جمع‌آوری گردید. پس از بررسی‌های اولیه فنوتیپی و بیوشیمیایی، از روش مولکولی PCR در ناحیه 16s rRNA و تعیین توالی این ناحیه جهت شناسایی باکتری‌های جداشده استفاده گردید. پس از مقایسه توالی‌های به‌دست آمده با توالی باکتری‌های دیگر موجود در پایگاه داده NCBI ژنوتیپ جدایه‌های به‌دست آمده مشخص گردید. بررسی‌ها نشان داد جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق، شباهت نوکلئوتیدی ۹۹٪ به *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 دارند. به نظر می‌رسد *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 در فرآوری و کیفیت ماست‌های محلی نقش بسزایی ایفا می‌کند.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۴۲) خواص پروبیوتیکی، ضدمیکروبی، ضدبیوفیلم و ایمنی *Lacticaseibacillus paracasei B31-2* جداشده از ماست محلی را بررسی کردند. سویه در برابر شرایط اسیدی و نمک‌های صفراوی انعطاف‌پذیری بالایی از خود نشان داد. میزان آبگریزی سطح سلول آن ۵۵/۴۲٪، تجمع ۲۵/۸۰٪، خودتجمع ۴۲/۵۰٪ و ظرفیت چسبندگی ۱۲/۶۰ ٪ را داشت. همچنین سویه هیچ گونه اثر همولیتیک، DNase و آمین‌بیوژنیک از خود نشان نداد. طباطبایی یزدی و همکاران (۱) روی پتانسیل باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از کیمچی کار کردند، آن‌ها از بین ۳ نمونه کیمچی ۸۵ سویه را جدا و ۵۵ ایزوله مربوط به جنس*Lactobacillus*، *Pediococcus* و *Leuconostoc* را انتخاب و مورد آزمون قرار دادند. مقاومت ۵۵ جدایه را در برابر اسید در pH ۲ تا ۷ مورد بررسی قرار دادند. سویه متعلق به *Pediococcus pentosaceus* بیشترین مقاومت به اسید را داشت و در pH ۲ به میزان ۶۲/۲٪ زنده ماند و زمانی‌که pH ۳ شد بیش از ۲۷٪ سویه‌ها درجه زنده‌مانی بیش از ۷۵٪ را از خود نشان دادند. همچنین مقاومت به نمک‌های صفراوی سویه *pentosaceus* بالاترین مقاومت و سویه متعلق به 03956 IF *Lactobacillus fermentum* حساس‌ترین سویه به نمک‌های صفراوی بود.

در مطالعه دیگر علیزاده بهبهانی و همکاران (۴۵) ویژگی‌های پروبیوتیکی *Levilactobacillus brevis HL6* و کاربرد آن در آب هلو را بررسی کردند. سویه آبگریزی، تجمع، خودتجمع، ظرفیت چسبندگی، فعالیت آنتی‌اکسیدان و توانایی حذف کلسترول قابل توجهی از خود نشان داد. *Staphylococcus aureus* بیشترین حساسیت را به سوپرناتانت بدون سلول سویه داشت، در حالی که *E. coli* مقاوم‌ترین بود. علاوه بر این، تقریبا به تمام آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش‌شده حساسیت نشان داد. اچرش و همکاران (۴۱) روی باکتری *Lacticaseibacillus rhamnosus* CWKu -12 پژوهش کردند. متوجه شدند که این سویه آبگریزی قابل توجهی در سطح سلولی۵۲/۶۰٪، سرعت تجمع خودکار۳۶/۶۰٪، هم‌انباشتگی ۲۹/۱۰ ٪ و توانایی چسبندگی سلولی ۱۱/۸۰٪ را دارا می‌باشد. نوشاد و همکاران (۲)، با بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی که روی باکتری‌های لاکتیک اسید دوغ انجام دادند، متوجه شدند که سوپرناتانت اسیدی فاقد سلول تاثیر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به سوپرناتانت‌های فاقد سلول‌های خنثی شده، است. سوپرناتانت خنثی شده *L. delbrueckii* و *L. Plantarum* علیه *E. coli* هیچ اثر ضدمیکروب نداشته وکمترین قطر هاله بازدارندگی در برابر سوپرناتانت اسیدی *L. plantarum* و *L. delbrueckii* و *P. pentosaceus* مربوط به *E. coli* می‌باشد. علیزاده بهبهانی و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

همکاران (۴۳) خواص پروبیوتیکی، ضدباکتریایی، ضدبیوفیلم و ایمنی *Lactococcus lactis NJ 414* را بررسی کردند. سویه در رقابت، جابجایی و جلوگیری از چسبندگی *L. monocytogenes* به ترتیب با نرخ ۳۷/۸۰ ٪، ۲۴/۵۰ ٪ و ۳۳/۴۰ ٪ توانایی خود را نشان داد. سویه فعالیت ضدمیکروبی قوی در برابر *L. monocytogenes* با میزان بازدارندگی ۱۱/۲۰ میلی‌متر در دیسک دیفیوژن آگار و ۱۱/۷۵ میلی‌متر در آگار انتشار چاه را نشان داد در حالی که *E. coli* کمترین حساسیت را با ناحیه بازدارندگی داشت.

علیزاده بهبهانی و همکاران (۴۴) در پژوهشی خواص پروبیوتیکی، ضدمیکروبی و ضدبیوفیلم *Lactiplantibacillus pentosus SM1* را بررسی کردند. قابلیت ضدچسبندگی آن در برابر چسبندگی *L. monocytogenes* به سلول‌های Caco-2 با توانایی آن در رقابت، مهار و جابجایی به ترتیب ۵۴/۱۰٪، ۴۸/۸۰٪ و ۲۳/۹۰٪ را نشان داد. سویه دارای فعالیت ضدمیکروبی وسیعی به ویژه در برابر باکتری‌های گرم مثبت است. همچنین نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین مقاومت بالایی را داشت، در حالی که در برابر اریترومایسین ضعیف بود.

۵. نتیجه‌گیری

جمع‌آوری مشخصات سویه‌های بومی هر ناحیه از کشور می‌تواند علاوه بر حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی، اطلاعات مفید برای استفاده‌های علمی ارائه نماید. علاوه بر این با توجه به هزینه زیادی که صرف واردات باکتری‌های آغازگر جهت تولید ماست می‌شود، با شناسایی آغازگرهای بومی وصنعتی‌سازی آن-ها می‌توان از خروج ارز جلوگیری کرد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد آغازگرهای بومی توانایی تولید عطر و طعم مطلوب مطابق با ذائقه ایرانی را دارا هستند. در تحقیق حاضر، ماست محلی مورد مطالعه قرارگرفت و مشخص شد این محصول حاوی *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 می‌باشد. این باکتری‌ها در کیفیت و مزه این ماست مؤثر هستند لذا می‌توان از آن‌ها به‌عنوان آغازگر در تولید ماست‌های صنعتی بهره برد. علاوه بر این، استفاده منطقی از پسماندهای صنعتی می‌تواند به کاهش اثرات زیست محیطی صنایع لبنی کمک کند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان جهت حمایت مالی طرح پژوهشی به‌شماره ۱۴۰۳/۲۳ که این مقاله مستخرج از آن می‌باشد، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

• References

1. Tabatabaei Yazdi F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi S A. Evaluation of Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi Produced in Iran. Qom Univ Med Sci J 2015; 9 (5) :11-22
2. Noshad, M., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M. Investigation of probiotic and technological characteristics of lactic acid bacteria isolated from native Doogh of Behbahan. Food Research Journal, 2021; 31(4): 169-186. doi: 10.22034/fr.2021.42303.1768
3. Aboutalebi, H., HEYDARI, N. M., TAJABADI, E. M., Shabani, M., & Zahedi, F. (2010). The Healing Effect of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Iranian Traditional Cheese on Acetic Acid Induced Gastric Ulcer in Rats. *Razi Journal of Medical Sciences*, *17*(77) ,7-16.
4. Sanders, M. E., & Klaenhammer, T. R. (2001). Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of dairy science*, *84*(2), 319-331.
5. Torres-Llanez, M. J., Vallejo-Cordoba, B., Díaz-Cinco, M. E., Mazorra-Manzano, M. A., & González-Córdova, A. F. (2006). Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food control*, *17*(9), 683-690.
6. Lee, B. J., & Bak, Y. T. (2011). Irritable bowel syndrome, gut microbiota and probiotics. *Journal of neurogastroenterology and motility*, *17*(3), 252.
7. Hawaz, E. (2014). Isolation and identification of probiotic *lactic acid* bacteria from curd and in vitro evaluation of its growth inhibition activities against pathogenic bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, *8*(13), 1419-1425.
8. Rushdy, A. A., & Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial compounds produced by probiotic *Lactobacillus brevis* isolated from dairy products. *Annals of Microbiology*, *63*, 81-90.
9. Osuntoki, A., & Korie, I. (2010). Antioxidant activity of whey from milk fermented with *Lactobacillus* species isolated from Nigerian fermented foods. *Food Technology and Biotechnology*, *48*(4), 505-512.
10. El Kafsi, H., Binesse, J., Loux, V., Buratti, J., Boudebbouze, S., Dervyn, R., ... & van de Guchte, M. (2014). *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* and *ssp. bulgaricus*: a chronicle of evolution in action. *BMC genomics*, *15*, 1-12.
11. Van De Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., ... & Maguin, E. (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(24), 9274-9279.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

12. Nikolaou, A., Saxami, G., Kourkoutas, Y., & Galanis, A. (2011). A new methodology for rapid detection of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* based on multiplex PCR. *Journal of microbiological methods*, *84*(2), 362-364.

13. Weiss, N., Schillinger, U., & Kandler, O. (1983). *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus leichmannii* and *Lactobacillus bulgaricus*, Subjective Synonyms of *Lactobacillus delbrueckii*, and Description of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* comb. nov. and *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* comb. nov. *Systematic and applied microbiology*, *4*(4), 552-557.

14. Dellaglio, F., Felis, G. E., Castioni, A., Torriani, S., & Germond, J. E. (2005). *Lactobacillus delbrueckii subsp. indicus subsp. nov*., isolated from Indian dairy products. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *55*(1), 401-404.

15. Kudo, Y., Oki, K., & Watanabe, K. (2012). *Lactobacillus delbrueckii subsp. sunkii subsp. nov*., isolated from sunki, a traditional Japanese pickle. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *62*(Pt_11), 2643-2649.

16. Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Vogensen, F. K., Sawadogo-Lingani, H., Derkx, P. M., & Jespersen, L. (2013). *Lactobacillus delbrueckii subsp. jakobsenii subsp. nov*., isolated from dolo wort, an alcoholic fermented beverage in Burkina Faso. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *63*(Pt_10), 3720-3726.

17. Song, Y., Sun, Z., Guo, C., Wu, Y., Liu, W., Yu, J., ... & Zhang, H. (2016). Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus* isolated from naturally fermented dairy foods. *Scientific reports*, *6*(1), 22704.

18. Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E., Chiavari, C., & Grazia, L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Le Lait*, *80*(5), 479-490.

19. Durlu- Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., & Litopoulou- Tzanetaki, E. (2001). Technologically important properties of *lactic acid* bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of applied microbiology*, *91*(5), 861-870.

20. EM, B. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, *63*, 189-197.

21. Ayhan, K., DURLU- ÖZKAYA, F. Ü. G. E. N., & Tunail, N. (2005). Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus* thermophilus and *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *International journal of dairy technology*, *58*(3), 150-157.

22. Ghotbi, M., Zad, S. S., & Sheikh-Zeinoddin, M. (2010). Identification of facultative heterofermentative *Lactobacillus* species in Lighvan cheese.

23. LATIFI, H., Hejazi, M. A., MALEKI, Z. B., & BARZEGARI, A. A. (2010). Isolation, Biochemical and Molecular Identification of Potentiallly Probiotic Bacteria from Traditional Dairy Products from Heris and Sarab Regions. *Journal of Food Industry Researchs*, *20*(1),1-17.

24. Falah, F., Vasiee, A., Alizadeh Behbahani, B., Tabatabaee Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2021). Optimization of gamma- aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge- based culture medium through response surface methodology. *Food science & nutrition*, *9*(6), 3317-3326.

25. Falah, F., Zareie, Z., Vasiee, A., Tabatabaee Yazdi, F., Mortazavi, S. A., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Production of synbiotic ice-creams with *Lactobacillus brevis* PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*, *15*(6), 5537-5546.

26. Falah, F., Vasiee, A., Yazdi, F. T., & Alizadeh Behbahani, B. (2021). Preparation and functional properties of synbiotic yogurt fermented with *Lactobacillus brevis* pml1 derived from a fermented cereal- dairy product. *BioMed research international*, *2021*(1), 1057531.

27. Vasiee, A., Falah, F., Sankian, M., Tabatabaei-Yazdi, F., & Mortazavi, S. A. (2020). 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*(1), 2635230.

28. Vasiee, A., Falah, F., & Mortazavi, S. A. (2022). Evaluation of probiotic potential of autochthonous *lactobacilli* strains isolated from Zabuli yellow kashk, an Iranian dairy product. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(5), 3201-3214.

29. Arian, S., Kaboosi, H., Heshmatipour, Z., Khazaei-Koohpar, Z., & Peyravii-Ghadikolaii, F. (2019). Molecular analysis of seven *Lactobacillus* strains isolated from human origin in West of Mazandaran. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, *13*(1), 56-68.

30. TR, K. (2018). Probiotic potency of *Lactobacillus plantarum* KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut. *FEMS microbiology letters*, *365*(4), fnx285.

31. Beumer, R. R., De Vries, J., & Rombouts, F. M. (1992). Campylobacter jejuni non-culturable coccoid cells. *International Journal of Food Microbiology*, *15*(1-2), 153-163.

32. Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*, *226*, 1065-1073.

33. Jiang, M., Zhang, F., Wan, C., Xiong, Y., Shah, N. P., Wei, H., & Tao, X. (2016). Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* WLPL04 isolated from human breast milk. *Journal of Dairy Science*, *99*(3), 1736-1746.

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

35. Maia, O. B., Duarte, R., Silva, A. M., Cara, D. C., & Nicoli, J. R. (2001). Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with *Salmonella enterica*

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

subsp. enterica ser. Typhimurium. *Veterinary microbiology*, *79*(2), 183-189.

36. Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food chemistry*, *73*(2), 239-244.
37. Moayedi, A., Mahmoudi, M., Khomeiri, M., & Loghman, S. (2019). Isolation, molecular identification and safety assessment of proteolytic *lactic acid* bacteria obtained from different raw milks. *Journal of food science and technology (Iran)*, *16*(89), 59-69.
38. Barzegar, H., Alizadeh Behbahani, B., & Falah, F. (2021). Safety, probiotic properties, antimicrobial activity, and technological performance of *Lactobacillus* strains isolated from Iranian raw milk cheeses. *Food Science & Nutrition*, *9*(8), 4094-4107.
39. Cebeci, A., & Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food microbiology*, *20*(5), 511-518.
40. Albayrak, Ç. B., & Duran, M. (2021). Isolation and characterization of aroma producing *lactic acid* bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. *Lwt*, *150*, 112053.
41. Echresh, S., Alizadeh Behbahani, B., & Falah, F., Noshad, M., & Ibrahim, S. A. (2024). Assessment of the probiotic, anti-bacterial, and anti-biofilm characteristics of *Lacticaseibacillus rhamnosus* CWKu-12, along with its potential impact on the expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115. *LWT*, *203*, 116391.
42. Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Taki, M., & Falah, F. (2024). Evaluation of the probiotic, anti-bacterial, anti-biofilm, and safety properties of *Lacticaseibacillus paracasei* B31-2. *LWT*, *207*, 116676.
43. Alizadeh Behbahani, B., & Noshad, M. (2024). An investigation into the probiotic, anti-bacterial, anti-biofilm, and safety properties of *Lactococcus lactis* NJ414. *LWT*, 116251.
44. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., Namazi, P., & Vasiee, A. (2024). Exploring the probiotic potential of *Lactiplantibacillus pentosus* SM1: resistance, anti-microbial activity, anti-biofilm, cytotoxic activity, and safety properties. *LWT*, 116850.
45. Alizadeh Behbahani, B., Jooyandeh, H., Hojjati, M., & Sheikhjan, M. G. (2024). 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]

Evaluation of Probiotic, Antimicrobial, and Antibiofilm Activities of the Postbiotic from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* MG5226 Against *Escherichia coli* and Its Effects on the Caco-2 Cell Line

*Alizadeh Behbahani B[*1], Jooyandeh H[2], Hojjati M[2], Echresh S[3], Mousavi Z[3]*

*1- *Corresponding Author: 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. Email: B.alizadeh@asnrukh.ac.ir*

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- MS. student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran

Received 29 Dec, 2025 **Accepted 25 Feb, 2026**

Background and Objective: The long-standing importance of consuming dairy products, attributed to the presence of beneficial microbial flora and their metabolites, has consistently highlighted their role in human health. The aim of the present study was to isolate and identify *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 present in local yogurt using molecular methods.

Materials and Methods: For the molecular identification of *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226, 16S rRNA primers were used. Probiotic, antimicrobial, and immune tests of the strain included survival in acidic and bile conditions, hydrophobicity, aggregation and co-aggregation, adhesion ability, anti-adhesion, agar disc and agar well methods, minimum inhibitory concentration, modified two-layer method, cholesterol reduction, antioxidant activity, biofilm formation and destruction, hemolytic activity, DNase production, biogenic amine production, and antibiotic resistance.

Results: The strain showed tolerance to bile salts and changes in pH. In addition, it exhibited significant cell surface hydrophobicity (64.80%), self-aggregation (43.90%), and cholesterol removal (40.53%). The strain demonstrated antimicrobial and antioxidant activity and was sensitive to a wide range of antibiotics. The competition, inhibition, and displacement rates against Escherichia coli in the presence of *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226 were 46.50%, 44.70%, and 26.80%, respectively. The strain did not show hemolytic activity, biogenic amine production, or DNase activity.

Conclusion: This study found that local yogurt contains *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* MG5226, which positively impacts the quality and flavor of the yogurt. Therefore, this bacterium can also be used as a starter culture in the production of industrial yogurts.

Keywords: Antioxidant capacity, Antimicrobial activity, Probiotic potential, Biofilm

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-12]

[DOI: 10.66224/nsft.21.3.83]