



## The Effect of *Lactiplantibacillus plantarum* from Motal Cheese on the Adhesion of *Cronobacter sakazakii* to Epithelial Cells

S.S. Fatemizadeh<sup>1</sup>, M.B. Habibi Najafi<sup>2\*</sup>, D.S. Nielsen<sup>3</sup>

Received: 2022.07.31

Revised: 2022.10.02

Accepted: 2022.11.23

Available Online: 2022.11.27

### How to cite this article:

Fatemizadeh, S.S., Habibi Najafi, M.B., & Nielsen, D.S. (2023). The effect of *Lactiplantibacillus plantarum* from Motal cheese on the adhesion of *Cronobacter sakazakii* to epithelial cells. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(4), 557-575. (In Persian with English abstract).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78002.1193>

### Introduction

*Cronobacter sakazakii* is an opportunistic pathogen, which has been linked to the contamination of powdered infant formula, and associated with outbreaks leading to fatalities in neonatal intensive care units. Few studies have explored the direct interaction between probiotics and *C. sakazakii*. In this study, the effect of a *Lactiplantibacillus plantarum* strain (M17) along with the standard strain *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014) and the well-characterized probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG on the adhesion of *C. sakazakii* to intestinal epithelial cells was analyzed.

### Materials and Methods

Acid and bile tolerance of M17 was evaluated in the presence of pepsin and pancreatin. L-arginine hydrolysis was investigated using an arginine-including medium. Auto-aggregation and co-aggregation assays were performed by absorbance measurement. Minimum inhibitory concentrations of the antimicrobials recommended by the European Food Safety Authority were established. Total lactic acid and the ratio of D/L lactate isomers were determined with a Megazyme enzymatic kit. The ability of the isolate to produce biogenic amines was tested by qualitative and quantitative monitoring. Hemolysis was assessed phenotypically on MRS agar enriched with sheep blood. The strain was tested for its capability to adhere to mucin and Caco-2 cells. The antagonistic effects of the strain against *C. sakazakii* were further evaluated *in vitro* on mucin and cultured Caco-2 cells. The LAB strain was added simultaneously with, before, and after *C. sakazakii* to Caco-2 cells for competition, exclusion and displacement assays, respectively. Data analysis was performed in R using one-way analysis of variance, and the experimental groups were compared with the controls using Tukey's test. P values <0.05 were considered statistically significant.

### Results and Discussion

There was no significant difference in the survival rate of M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 at pH = 4. After 2 h of incubation at pH = 2.5, the survival rate of *L. plantarum* ATCC 8014 was estimated to be higher than strain M17, but this difference was not significant. After 4 hours of incubation at pH = 8, M17 showed a higher survival rate than *L. plantarum* ATCC 8014, and this difference was significant after transfer from pH = 4. These results confirm the appropriate viability of M17 in the gastrointestinal tract. Both M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 developed the color yellow in the L-arginine hydrolysis assay, which confirms the safety of these strains. The percentage of auto-aggregation for M17, *L. plantarum* ATCC 8014, and *Lactobacillus rhamnosus* LGG was estimated at 24.38, 25.28, and 32 after 6 hours, respectively, and no statistically significant difference between the two isolates were noticed. Given the auto-aggregation and co-

1 and 2- Ph.D. Graduate and Professor of Department of Food Science, Ferdowsi University of Mashhad, Iran  
(\*- Corresponding Author Email: [habibi@um.ac.ir](mailto:habibi@um.ac.ir))

3- Professor of Department of Food Science, Copenhagen University, Denmark  
DOI: [10.22067/ifstrj.2022.78002.1193](https://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.78002.1193)

aggregation parameters of M17, this strain may constitute a defense mechanism against *C. sakazakii*. Strain M17 showed resistance to kanamycin and clindamycin antibiotics. With intrinsic resistance, the risk of transferring resistance genes is not only speculative, but practically impossible. Intrinsic resistance of lactic acid bacteria may be considered desirable because it ensures their survival when the host is treated with antibiotics. Both D and L isomers of lactic acid were produced by the studied strains. In humans, D(-)-lactic acidosis is a rare metabolic complication that has only been reported in individuals with short bowel syndrome). Clinical studies have shown that the consumption of probiotic bacteria producing D(-)-lactic acid is safe for children and does not cause a long-term increase in blood D(-)-lactic acid. The reference *L. plantarum* strain and M17 did not produce biogenic amine precursors, and had no  $\beta$ -hemolytic activity. Mucin adhesion assay exhibited that M17 has less adhesion ( $12.10 \pm 1.14$  %) than *L. plantarum* ATCC 8014 ( $13.33 \pm 2.30$  %) and LGG ( $15.93 \pm 2.06$  %) although these differences were not statistically significant. However, the amount of adhesion for the positive control sample *Escherichia coli* K12 ( $25.19 \pm 4.40$  %) was significantly higher than those of the other strains. Compared to the positive control, M17 had a significantly lower adhesion rate ( $6.8 \pm 1.41$ ) to CaCo-2 cells. This value was estimated at  $13.77 \pm 3.53$  % for the reference strain and  $21.6 \pm 7.54$  % for *Lactobacillus fermentum* PCC (positive control). In antagonistic assays, M17 was able to reduce the adhesion of *C. sakazakii* to mucin and CaCo-2 cells in all three methods of exclusion/inhibition, competition and displacement. Statistical analysis of the results does not show a significant difference between M17 and LGG. Therefore, the performance of M17 is similar to that of the standard probiotic LGG.

### Conclusion

Lactic acid bacteria with acceptable ability to adhere to epithelial cells can be suitable for colonization in the intestine. They can act as a barrier to fight pathogens through various competitive mechanisms, such as co-aggregation with pathogens and adhesion. The M17 strain has an acceptable immune profile and probiotic properties because it shows an acceptable antagonistic activity against *C. sakazakii* invasion.

### Acknowledgement

This study was supported by Ferdowsi University of Mashhad (Research affairs) [project No.:46718] and the research infrastructure at the University of Copenhagen.

**Keywords:** *Cronobacter sakazakii*, *In vitro* properties, *Lactiplantibacillus plantarum*, Probiotic

## مقاله پژوهشی

# اثر لاکتی پلانسی باسیلوس پلانتاروم پنیر موتال بر چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های روده‌ای

سعیده سادات فاطمی زاده<sup>۱</sup> - محمد بافر حبیبی نجفی<sup>۲\*</sup> - دنیس سندریس نیلسن<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۲

### چکیده

کرونوباکتر ساکازاکی موجب نگرانی تولیدکنندگان شیرخشک نوزادان است. در این مطالعه ایزوله لاکتی پلانسی باسیلوس پلانتاروم M17 از پنیر سنتی موتال (شماره دسترسی KX572391) به همراه سویه استاندارد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ATCC ۸۰۱۴) جهت کنترل کرونوباکتر ساکازاکی مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی خواص پروبیوتیکی و ایمنی، آزمون‌هایی جهت بررسی بقای جدایه، هیدرولیز ال-آرژنین، خود انبوهش، حساسیت آنتی بیوتیکی، تولید ایزومرهای اسید لاکتیک، تولید آمین‌های بیوژنیک، فعالیت همولیتیک، چسبندگی به موسین و چسبندگی به سلول‌های Caco-2 صورت پذیرفت. به منظور بررسی اثر ایزوله M17 بر کرونوباکتر ساکازاکی، پارامترهای هم انبوهش، چسبندگی به موسین و چسبندگی به سلول‌های Caco-2 به همراه باکتری استاندارد پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس LGG صورت پذیرفت. سویه M17 ۹۱٪ در شرایط مشابه اسید معده و ۸۹٪ در غلظت مشابه نمک‌های صفاوی زنده ماند، و توانایی خود انبوهش بیش از ۲۴٪ را نشان داد. چسبندگی ایزوله M17 در شرایط برون تنی به موسین و سلول‌های Caco-2 به ترتیب در مقادیر ۱۲ و ۷٪ ثبت شد. ایزوله مورد مطالعه دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی در مقایسه با نمونه استاندارد است و می‌تواند کاندید مناسبی جهت استفاده به عنوان پروبیوتیک در شیرخشک نوزادان باشد. با این حال، در آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی، ایزوله M17 در برابر کانامایسین و کلیندامایسین مقاومت نشان داد، که این ویژگی امکان استفاده از این ایزوله را محدود خواهد کرد. نتایج برآورد اثر پروبیوتیکی M17 بر کرونوباکتر ساکازاکی نشان از عملکرد مشابه با سویه استاندارد LGG دارد.

**واژه‌های کلیدی:** پروبیوتیک، کرونوباکتر ساکازاکی، لاکتی پلانسی باسیلوس پلانتاروم، ویژگی‌های برون تنی

### مقدمه

پودر شیر خشک است که با شیوع بیماری در نوزادان، به خصوص در بخش‌های مراقبت‌های ویژه نوزادان مرتبط است (Bowen & Braden, 2006). مطالعات نشان داده که pH معده نوزادان نسبت به بزرگسالان بالاتر بوده (خنثی در بدو تولد و بین ۲/۳ الی ۳/۶ تا ۳ سالگی) (Blackburn, 2016; Erickson et al., 2005) و این امر

کرونوباکتر<sup>۴</sup>ها، باکتری‌های میله ای گرم منفی، متحرک، غیر اسپورزا و تاژک دار عضو خانواده اکتروباکتریاسه<sup>۵</sup> هستند (Farmer et al., 1980; Food Safety Authority of Ireland, 2011). کرونوباکتر ساکازاکی<sup>۶</sup> یک پاتوژن فرصت طلب و عامل مهم در آلودگی

۱ و ۲- به ترتیب دانش‌آموخته دکتری و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران  
(Email: habibi@um.ac.ir)

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم، دانشگاه کپنهاگ، دانمارک

اندکی به بر هم کنش مستقیم بین پروبیوتیک و باکتری کرونوباکتر ساکازاکی پرداخته اند. در این مطالعه، برای اولین بار اثر جدایه لاکتی پلانته باسیلوس پلانتروم بر چسبندگی باکتری کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های اپی‌تلیال روده ای، بررسی شد.

### مواد و روش‌ها

#### آماده‌سازی و فعال‌سازی جدایه لاکتوباسیلوس فرآورده لبنی سنتی

باکتری لاکتوباسیلوس مورد استفاده در این مطالعه، در پژوهش عزیز و همکاران (Azizi et al., 2017) از فرآورده لبنی سنتی پنیبر موتال جداسازی شد. به منظور فعال‌سازی جدایه در دسترس، نمونه از فریزر ۸۰- (Holm & Halby, پرونی، دانمارک) خارج و در بن ماری دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس محتویات تیوب بر روی محیط کشت MRS آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد (Holm & Halby, پرونی، دانمارک).

#### آماده‌سازی کشت‌های کرونوباکتر ساکازاکی

کرونوباکتر ساکازاکی از مرکز کلکسیون باکتری دانشگاه گوتنبرگ با شماره دسترسی CCUG 28860 خریداری شد. به منظور فعال‌سازی، کرونوباکتر ساکازاکی به صورت کشت شبانه در محیط کشت BHI برات و سپس روی محیط کشت VRBG آگار (oxid، راسکیله، دانمارک) در شرایط میکروآتروفیلیک با استفاده از جار بی‌هوازی و گازپک در دمای ۳۷°C کشت داده شد (Charchohlyan et al., 2016).

#### ارزیابی بقای جدایه لاکتوباسیلوس در مدل برون‌تنی نیمه دینامیک

برای انجام این آزمایش از روش Kos et al., 2000 با اصلاحات جزئی استفاده شد. از باکتری لاکتوباسیلوس پلانتروم ۸۰۱۴ ATCC (خریداری شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران) به عنوان نمونه شاهد در این آزمایش استفاده گردید. به شکل مختصر، ابتدا نمونه های شاهد و لاکتی پلانته باسیلوس به مدت ۲۴ ساعت در MRS برات کشت داده شدند. محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۲۸۱۰ × g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 3\_30K، آلمان) و سپس با استفاده از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ سه بار شستشو داده شد. حجم‌های دو میلی‌لیتری از سوسپانسیون سلول‌های شسته شده به

می‌تواند بقای کرونوباکتر را تسهیل کند (Pagotto & Farber, 2009).

اگر چه بروز بیماری توسط کرونوباکتر ساکازاکی به طور کلی ناچیز است، اما میزان مرگ و میر نوزادان به علت درگیری با این باکتری ۳۳-۸۰٪ گزارش شده است (Lai, 2001; Gurtler; Drudy et al., 2006; Nazarowec-White & Farber, 1997; et al., 2005). در نتیجه چسبیدن و تهاجم باکتریایی به خطوط سلولی اندوتلیال مویرگی مغز انسان، بیماری اغلب منجر به تأخیر نمو و اختلال در عملکرد ادراکی می‌شود. تعدادی از مطالعات نشان داده اند که پروتئین‌های غشای خارجی A و X کرونوباکتر ساکازاکی در حمله و عبور از سلول‌های اندوتلیال مویرگی مغز، که سد خونی-مغزی را تشکیل می‌دهند، نقش دارند (Mohan Nair et al., 2009).

حضور محافظ میکروبیولوژیکی در شیر خشک می‌تواند به ننگ داشتن ارگانسیم بیماری زا در مقادیر کم پس از بازسازی کمک کند و خطر ابتلا به بیماری فاجعه بار را کاهش دهد (Kent et al., 2015). پروبیوتیک‌ها در حال حاضر به عنوان میکروارگانسیم‌های زنده ای تعریف می‌شوند که به هنگام استفاده در مقادیر کافی، بر سلامت میزبان تأثیر مثبتی می‌گذارند (Guarner & Schaafsma, 1998; CODEX Alimentarius Commission, 2008). مطالعات علمی اخیر در مورد خواص و عملکرد میکروارگانسیم‌های زنده در مواد غذایی نشان می‌دهد که پروبیوتیک‌ها نقش مهمی در فعالیت‌های ایمونولوژیکی، گوارشی و تنفسی ایفا می‌کنند و می‌توانند تأثیر قابل توجهی در کاهش بیماری های عفونی در کودکان داشته باشند (FAO/WHO, 2006b). هانتز و همکاران (Hunter et al., 2009) نشان دادند که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس از آسیب سلول‌های اپی‌تلیال روده ای ناشی از اکسید نیتریک تولید شده در نتیجه حضور کرونوباکتر ساکازاکی در یک مدل نوزاد موش مبتلا به اتروکولیت نکروزان جلوگیری می‌کند (Hunter et al., 2009). کولادو و همکاران (Collado et al., 2008a) برای مقابله با چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به مخاط جدا شده از انسان، سویه‌های پروبیوتیک را مورد آزمایش قرار دادند (این مطالعه شامل LGG نبود).

به منظور فراهم کردن مواد غذایی فراسودمند برای یک جمعیت هدف، انتخاب منطقی بهترین کاندیداهای پروبیوتیک با اثبات ادعاهای سلامتی بخش آنها توصیه می‌شود (Arbolea et al., 2012). بنابراین خواص ویژه سویه‌های پروبیوتیک باید با دقت تعیین و تأثیر هر سویه بر سلامت میزبان به صورت موردی نشان داده شود (Campana et al., 2017). باکتری‌های پروبیوتیک مختلفی شناسایی شده‌اند که قادر به مهار پاتوژن‌های بالقوه هستند. با این حال، مطالعات

سوسپانسیون سلولی در ۱۰ ml بافر PBS تا حدود  $10^8$  CFU/ml (۳-۲-۰/۳) مجدداً حل گردید. هر سوسپانسیون برای ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در دمای اتاق به مدت ۶ ساعت انکوباسیون شد. سپس در هر ساعت، ۱ ml از سوسپانسیون بالایی برداشته شده و جذب در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Thermo Fisher، Genesys 30، Scientific، آمریکا). درصد خود انبوهش (Auto-A%) طبق فرمول ۱ محاسبه گردید (Campana et al., 2017).

$$\text{Auto-A\%} = 1 - (A_t/A_0) \times 100 \quad (1)$$

که در آن  $A_t$  جذب در زمان‌های مختلف و  $A_0$  جذب در زمان صفر است. نتیجه نهایی خود انبوهش بر مبنای آخرین میزان جذب (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) ذکر می‌شود.

برای آزمون هم انبوهش، مقادیر ۲ میلی‌لیتری از سوسپانسیون‌های باکتریایی لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر با غلظت استاندارد سلولی (۰/۰۵  $\pm 0.25$  cells/ml،  $A_{600 \text{ nm}} = 0.5$ ، مک فارلند) به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق بدون تکان دادن قرار گرفت. نمونه‌های حاوی مقادیر ۴ میلی‌لیتری از سوسپانسیون باکتری لاکتوباسیلوس پلاتناروم (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در هر ساعت، ۱ ml از سوسپانسیون بالایی برداشته شده و جذب مخلوط‌ها (لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر ساکازاکی) طی ۴ ساعت انکوباسیون بررسی شد. نتیجه نهایی هم انبوهش بر مبنای آخرین میزان جذب (پس از ۶ ساعت انکوباسیون) ذکر می‌شود. جذب برای مخلوط و برای سوسپانسیون‌های باکتری به تنهایی تعیین، و درصد هم انبوهش طبق معادله زیر محاسبه شد، که در آن  $A_x$  و  $A_y$  به ترتیب نشان‌دهنده خواص انبوهش جدایه‌های لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر به تنهایی و  $A(x+y)$  انبوهش ترکیبی جدایه‌های لاکتوباسیلوس و کرونوباکتر است. همه آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شدند (Campana et al., 2017).

$$\% \text{Coaggregation} = \frac{((A_x + A_y)/2) - A(x+y)}{A_x + A_y/2} \times 100 \quad (2)$$

#### حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه لاکتوباسیلوس

جدایه لاکتوباسیلوس از لحاظ انتقال ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج انسانی که قابل انتقال هستند، مورد بررسی قرار گرفت. اساس روش شامل تست مقاومت/حساسیت بر اساس آزمون میکرودیولوشن است (Polka et al., 2016). بدین منظور، جدایه لاکتوباسیلوس به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت MRS آگار و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این آزمایش بر اساس پیشنهادات اداره ایمنی مواد غذایی اروپا، جنتامایسین (۱۲۸ mg/L)، کانامایسین (۱۰۲۴ mg/L)، استرپتومایسین (۲۵۶ mg/L)، تتراسایکلین (۶۴ mg/L)، اریترومایسین

فلاسک‌های استریل حاوی ۱۰ میلی‌لیتر شیره معده متشکل از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ در pH ۲/۵ و ۴/۰، تنظیم شده با اسید کلریدریک ۱ مولار و پیپسین (سیگما، آمریکا) اضافه شده (۳ گرم در لیتر) منتقل شدند. پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک شیکر چرخان (۱۵۰ دور در دقیقه)، حجم‌های ۱ میلی‌لیتری از هر فلاسک در زمان‌های ۰، ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه خارج شده و شمارش سلول‌های زنده انجام گردید. سپس محیط کشت موجود در هر شیره معده با سانتریفوژ شدن در  $2810 \times g$  به مدت ۱۰ دقیقه شسته شده، در ۵ میلی‌لیتر محلول NaCl ۰/۵٪ به تعلیق در آمده و با ۱۰ میلی‌لیتر از مایعات شبیه سازی شده روده (متشکل از محلول استریل NaCl ۰/۵٪ در pH ۸/۰ حاوی صفرا (۱۰ g/l) و پانکراتین (۱ g/l)) مخلوط شدند. این مخلوط در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در یک شیکر چرخان (۱۵۰ دور در دقیقه) انکوباسیون و سپس حجم‌های ۱ میلی‌لیتری بعد از ۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه خارج و شمارش سلول‌های زنده انجام گردید. هر آزمایش سه بار تکرار و نتایج به صورت میانگین CFU/ml اعلام گردید (de Carvalho et al., 2009).

#### هیدرولیز ال-آرژنین جدایه لاکتوباسیلوس

بررسی هیدرولیز ال-آرژنین توسط جدایه لاکتوباسیلوس با کشت در محیط آرژنین دار و تغییر رنگ معرف نسلر انجام گردید. بدین منظور، یک کلنی یا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به محیط مایع حاوی ۰/۳٪ اسید آمینه ال-آرژنین منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت روی کاغذ صافی حاوی معرف نسلر قرار داده و تغییر رنگ بررسی گردید. ایجاد رنگ نارنجی مایل به قرمز نشان دهنده واکنش مثبت و برای استفاده در محصولات شیرخواران و غذای کودک، غیر قابل قبول است. در این آزمایش از استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC ۲۵۹۲۳) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

#### آنالیز انبوهش باکتریایی جدایه لاکتوباسیلوس

سویه‌های دارای بالاترین درصد خود انبوهش و هم انبوهش، سویه‌های پروبیوتیکی برتر محسوب می‌شوند (Collado et al., 2008b). آزمون خود انبوهش جدایه براساس روش دل ری و همکاران (Del Re et al., 2000) و توماس و همکاران (Tomás et al., 2005) پس از تغییر جزئی به شرح زیر انجام گردید. جدایه لاکتوباسیلوس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C در MRS براث در شرایط میکروآتروفیلیک با استفاده از جار بی‌هوایی و گازپک کشت داده شد. سپس محیط کشت باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ و

محدود تلقیح نشده) به مدت ۵ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و هر ۲۴ ساعت تغییر رنگ مشاهده شد. آزمایش‌ها در سه تکرار مستقل انجام شدند (Pérez Martínez *et al.*, 2012). به منظور تأیید تولید آمین‌های بیوژنیک، پس از ۵ روز، ۱/۲ میلی‌لیتر از محیط مرحله قبل جمع‌آوری، و به مدت ۳۰ دقیقه در  $g \times 9600 \times$  سانتریفیوژ شد. مایع رویی با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر در لوله‌های اپندورف استریل جدید فیلتر، و تا زمان مشتق‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. غلظت آمین‌های بیوژنیک مواد رویی با استفاده از UPLC بر اساس روش ردروئلو و همکاران (Redruello *et al.*, 2013) اندازه‌گیری شد. مایع رویی فیلتر ( $0.45 \mu m$ ) غشای استات سلولز، VWR، سوپورگ، دانمارک، و ۱۰ برابر در هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار رقیق شد. سپس به ۱۷۵ میکرولیتر از بافر بورات ۱ مولار (۹/۰ pH)، ۷۵ میکرولیتر متانول و ۲ میکرولیتر L-آمینو آدیپیک اسید (۰/۰۷ میلی‌مولار) اضافه شد. پس از آن، ۳ میکرولیتر دی اتیل اتوکسی متیلن مالونات (DEEMM) اضافه، مخلوط ورتکس شد، و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حمام اولتراسوند به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند تا DEEMM غیرفعال شود. نمونه‌ها سپس سانتریفیوژ شدند (۱۰ دقیقه در  $g \times 9600 \times$  و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) و با استفاده از یک غشای PTFE (۰/۲۲ میکرومتر، VWR) در ویال مخروطی (VWR) فیلتر شدند. مقدار ۱ میکرولیتر از نمونه مشتق شده (۱۶ درجه سانتی‌گراد) با استفاده از ابزار UPLC (سیستم H-Class Acquity UPLCTM، Waters، تاستروپ، دانمارک) متصل به یک حسگر آرایه فوتودیود در ۲۸۰ نانومتر، با یک ستون (Acquity BEH C18،  $1.7 \mu m$ )،  $1.7 \times 100$ ، واترز) در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، طبق روش گزارش شده توسط (Redruello *et al.*, 2013) مورد تحلیل قرار گرفت. معرف‌ها درجه HPLC بودند و از سیگما آلدریج (کپنهاگ، دانمارک) تهیه شدند. استاندارد با ۱۸ ترکیب آمینو از ترمو فیشر (راسکیله، دانمارک) خریداری شد. کروماتوگرام‌ها با تمام پیک‌های مربوط به ۳۰ ترکیب آمینو مورد بررسی (شامل ۲۲ اسید آمینو، یون آمونیوم و ۷ آمین بیوژنیک) در مدت ۱۰ دقیقه جدا شدند و پروفایل‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Empower (نسخه ۳، واترز) آنالیز شدند (Møller *et al.*, 2020).

#### ارزیابی فعالیت همولیتیک

به منظور برآورد فعالیت همولیتیک جدایه پروبیوتیک مورد مطالعه، آزمایش مطابق استاندارد ۱۹۴۵۹ صورت پذیرفت (Iranian National Standard No. 19459, 2014). بدین منظور جدایه لاکتوباسیلوس، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC ۲۵۹۲۳) و *لاکتوباسیلوس پلاننتاروم* (ATCC ۸۰۱۴) بر روی محیط کشت آگار حاوی خون گوسفند (۰/۷

(۱۶ mg/L)، کلیندامایسین (۳۲ mg/L)، آمپی سیلین (۱۶ mg/L)، ونکوماسین (۱۶ mg/L) و کلرامفنیکول (۶۴ mg/L) بود. تمام آزمون‌ها در پلیت‌های میکروبتیر ۹۶ چاهکی استریل (پلی‌استایرن) حاوی غلظت‌های مناسب آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق با پروتکل ISO/IDF انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $37^{\circ}C$  در شرایط بی‌هوای گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان دوره انکوباسیون، میزان رشد و تکثیر نمونه با مشاهده چشمی خوانده شد (Polka *et al.*, 2016). در این آزمایش از باکتری لاکتوباسیلوس پلاننتاروم (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان شاهد استفاده گردید.

#### ارزیابی تولید ایزومرهای لاکتیک اسید

تولید اسید لاکتیک در سوپرناتانت‌های حاصل از کشت هر یک از جدایه لاکتوباسیلوس و نمونه شاهد (لاکتوباسیلوس پلاننتاروم ۸۰۱۴ ATCC) رشد کرده در شرایط مطلوب خود با کیت تجاری (D-لاکتیک اسید/L-لاکتیک اسید، مگازایم) در سه تکرار مستقل تعیین گردید (Muñoz-Quezada *et al.*, 2013).

#### ارزیابی تولید آمین‌های بیوژنیک

توانایی برخی از سویه‌های لاکتوباسیلوس در تولید آمین‌های بیوژنیک سمی به وجود فعالیت آمینو اسید دکربوکسیلاز مرتبط است. از این رو، می‌توان از یک روش کیفی بر اساس تغییر رنگ شاخص بروموکروزول بنفش (سیگما آلدریج، کپنهاگ، دانمارک) از زرد به بنفش در حضور هیستیدین، لیزین، اورنیتین و تیروزین اضافه شده به یک محیط کشت محدود غربالگری (Bover-Cid & Holzapfel, 1999) حاوی تریپتون (۰/۵٪)، عصاره مخمر (۰/۵٪)، کلرید سدیم (۰/۵٪)، توئین ۸۰ (۰/۰۵٪)، سولفات منیزیم (۰/۰۲٪)، سولفات منگنز (۰/۰۰۵٪)، سولفات آهن (II) (۰/۰۰۵٪) و کربنات کلسیم (۰/۰۱٪) در pH ۵/۰، با نشانگر بروموکروزول بنفش و بدون افزودن گلوکز (Møller *et al.*, 2020) استفاده کرد. تغییر رنگ شاخص بروموکروزول بنفش از زرد به بنفش به عنوان فعالیت معنی دار آمینو اسید دکربوکسیلاز به حساب می‌آید که مربوط به حداقل ۳۵۰ میلی‌گرم از یک آمین بیوژنیک خاص / لیتر است (Olasupo *et al.*, 2001). برای انجام این آزمایش از سویه لاکتوباسیلوس برویس ۴۱۲۱ CECT به عنوان کنترل مثبت برای تولید تیرامین و سویه لاکتوباسیلوس پارابوچنری KUH8 به عنوان کنترل مثبت برای تولید هیستامین، لاکتوباسیلوس پلاننتاروم (ATCC ۸۰۱۴) به عنوان نمونه شاهد و جدایه M17 استفاده شد. سویه‌هایی که قبلاً در MRS برات کشت شده بودند، در ۱۰۰ میکرولیتر به محیط‌های محدود حاوی اسیدهای آمینو و بروموکروزول بنفش تلقیح شدند. لوله‌های تلقیح شده به همراه لوله‌های کنترل منفی (محیط



خون گوسفندی دفیبرینه) به روش نقطه ای کشت داده شدند. پلیت‌ها به صورت وارونه در دما و شرایط مناسب گرمخانه‌گذاری و پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، پلیت‌ها از نظر وجود هاله شفاف حاصل از هیدرولیز سلول‌های خونی در اطراف کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. وجود هاله شفاف نشان دهنده واکنش مثبت و همولیز نوع بتا است که از نظر ایمنی نامطلوب است.

**چسبندگی به موسین**

به منظور بررسی چگونگی اتصال باکتری به موسین از روش (Bengoa *et al.*, 2018) استفاده شد. به شکل مختصر، موسین (سیگما، آمریکا) با غلظت ۳ گرم در لیتر با استفاده از PBS حل و فیلتراسیون ( $0.22 \mu\text{m}$ ) گردید و سپس برای اتصال به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن استریل (Maxisorp Nunc، راسکیله، دانمارک) در آن وارد گردید. بدین منظور، پلیت به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. انکوباسیون مجدد به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد تا محل‌های اتصال خالی در پلیت پلی استایرن به حداقل برسد. در نهایت، پلیت با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر PBS دو بار شستشو داده شد. یک میلی لیتر از نمونه‌های باکتری کشت داده شده در  $1000 \times \text{g}$  و در ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ، و پلت تشکیل شده دو بار با محلول PBS شستشو داده شد. پلت باکتری در ۱ میلی لیتر محلول PBS حل گردید و سپس با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و در  $OD = 550 \text{ nm}$  غلظت باکتری‌ها در  $10^9$  واحد تشکیل دهنده کلنی تنظیم گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول هر باکتری به چاهک‌ها منتقل گردید. محیط به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گذاری شد. چاهک‌ها ۶ بار با استفاده از ۲۰۰ میکرولیتر محلول PBS شستشو داده شد تا باکتری‌هایی که اتصال پیدا نکرده اند از پلیت حذف شوند. دویست میکرولیتر از محلول ترایتون X100 با غلظت ۵ میلی لیتر/لیتر در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید تا باکتری‌های متصل شده آزاد شوند. صد میکرولیتر از هر چاهک خارج و در PBS رقیق شد و بر روی پلیت MRS آگار کشت داده شد. از سویه *اشرشیا کلی K12* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محیط‌های کشت به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و سپس شمارش کلنی صورت گرفت.

### جلوگیری از چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های CaCo-2

آزمون‌های مهار کنندگی شامل حذف، رقابت و جابجایی با استفاده از سویه M17 انجام شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی سویه M17 و کرونوباکتر ساکازاکی همان طور که در بالا توضیح داده شد، تهیه شدند. برای آزمون حذف، تک لایه‌های Caco-2 با ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون M17 به مدت ۱ ساعت تیمار و سپس با PBS شسته شدند تا باکتری‌های غیر چسبیده حذف شوند. در این مرحله، ۱ میلی لیتر از کرونوباکتر ساکازاکی به تک لایه‌های سلولی برای ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با  $5\% \text{ CO}_2$  اضافه شد. در پایان انکوباسیون، سلول‌ها ۳ الی ۵ بار با PBS شسته، و با تریتون X-۱۰۰ ( $0.5\%$  در PBS) لیز شدند. در نهایت، سلول‌های لیز شده به صورت سریالی در محلول نمکی فیزیولوژیکی رقیق شدند، به محیط کشت حاوی آگار منتقل و در شرایط کشت مناسب برای شمارش CFU/ml انکوبه شدند. برای آزمون رقابت، سلول‌ها در معرض سوسپانسیون مخلوط (۱:۱) از کرونوباکتر ساکازاکی و M17 قرار گرفتند. پس از ۳ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با  $5\% \text{ CO}_2$ ، تک لایه‌ها ۳ الی ۵ بار با PBS شسته، و با تریتون X-۱۰۰ ( $0.5\%$  در PBS) لیز شدند. سپس سلول‌های لیز شده به صورت سریالی در سالیین رقیق شدند، به محیط کشت حاوی آگار منتقل و در شرایط کشت مناسب برای شمارش

### چسبندگی به سلول‌های Caco-2

میزان چسبندگی جدایه M17 به سلول‌های ایپی تلیال مطابق استاندارد ۱۹۴۵۹ مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد

بافر PBS شسته شده و باکتری‌های متصل پس از افزودن تریتون ۱۰۰-X (۰/۵٪) شمارش شدند. سه آزمون مستقل و هر سنجش در سه تکرار انجام و درصد مهار پاتوژن با استفاده از فرمول ۳ محاسبه شد (Collado *et al.*, 2008b):

$$\% \text{inhibition} = \frac{(\% \text{ adherence of pathogen}) - (\% \text{ adherence of pathogen with probiotic})}{\% \text{ adherence of pathogen}} \times 100 \quad (3)$$

## تجزیه و تحلیل آماری

آنالیزهای آماری با بسته R انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون توکی ( $P < 0/05$ ) برای بررسی تفاوت‌های معنی دار بین تیمارها در سنجش چسبندگی مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به بقای سویه در شرایط مشابه دستگاه گوارش با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 انجام شد.

## نتایج

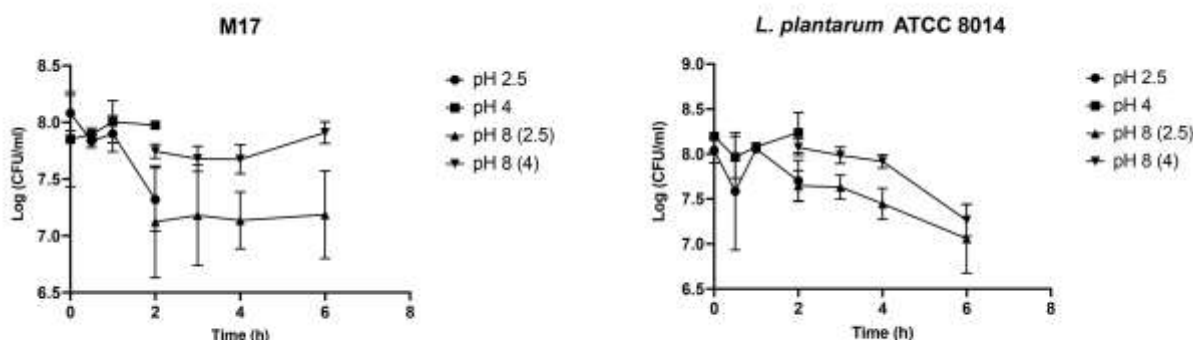
### شناسایی خواص پروبیوتیکی

میزان بقای جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ در فاصله زمانی ۶ ساعته تحت شرایط مشابه دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرار گرفت؛ حرکت توده غذا در دستگاه گوارش حداقل به ۶ ساعت زمان نیاز دارد (Grodner *et al.*, 2021). این آزمون شامل مقاومت در برابر pH پایین محیط، پپسین، نمک‌های صفرآوی و پانکراتین بود. شبیه سازی اثر انگوباسیون باکتری‌های جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ با شیربه معده و روده در شکل ۱ آورده شده است.

CFU/ml انگوبه شدند. برای ارزیابی توانایی سویه M17 در جابجایی با کرونیوباکتر ساکارازی، این باکتری به سلول‌های Caco-2 اضافه، و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انگوبه شد. پس از شستشو و حذف پاتوژن‌های غیر متصل، M17 به چاهک‌ها افزوده، و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انگوبه شدند. سپس، چاهک‌ها شسته، و سلول‌ها لیز شدند و شمارش باکتری‌ها انجام شد. مهار کرونیوباکتر ساکارازی به عنوان تفاوت بین چسبندگی کرونیوباکتر قبل و بعد از افزودن سویه M17 محاسبه شد. سه آزمون مستقل و هر سنجش در چهار تکرار انجام شد (Campana *et al.*, 2017).

### جلوگیری از چسبندگی کرونیوباکتر ساکارازی به موسین

به منظور ارزیابی توانایی سویه M17 در مهار، جابجایی و رقابت، روش (Collado *et al.*, 2008b) با برخی تغییرات استفاده شد. چاهک‌های پلی استایرن همان طور که قبلاً توضیح داده شد، آماده شدند. برای آزمون مهار، پس از انگوباسیون و شستشو، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی M17 ( $10^8$ – $10^9$  CFU/ml) به چاهک‌ها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت انگوبه شد. چاهک‌ها دو بار با PBS شسته شدند و اطمینان حاصل شد که بافر در چاهک‌ها باقی نمانده است. در مجموع ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کرونیوباکتر ساکارازی ( $10^8$  CFU/ml) اضافه، و به مدت ۱ ساعت انگوبه شد. برای سنجش جابجایی، روش فوق‌الذکر انجام شد، اما ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کرونیوباکتر ساکارازی به مدت ۱ ساعت به چاهک‌ها اضافه، و قبل از انگوباسیون با سوسپانسیون M17 شسته شد. برای آزمون رقابت، چاهک‌ها در معرض سوسپانسیون مخلوط (۱:۱) از کرونیوباکتر ساکارازی و M17 قرار گرفتند. در تمامی موارد، چاهک‌ها با



شکل ۱- شبیه سازی اثر انگوباسیون جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ در شیربه معده و روده در فاصله زمانی ۶ ساعته  
Fig. 1. Effect of incubation of isolate M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 in simulated gastric and intestinal juice for 6 hours



جدول ۱- درصد زنده‌مانی جدایه‌های M17 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ در شیر معده و روده در فاصله زمانی ۶ ساعته  
Table 1- Survival percentage of M17 and *L. plantarum* ATCC 8014 in simulated gastric and intestinal juice for 6 hours

سویه Strain	لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتاروم M17				لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴			
	pH	2.5	4	8 with initial pH 2.5 ۸ با pH اولیه ۲/۵	8 with initial pH 4 ۸ با pH اولیه ۴	2.5	4	8 with initial pH 2.5 ۸ با pH اولیه ۲/۵
Time (h)	2	2	6	6	2	2	6	6
ضریب زنده‌مانی (%) Survival rate	90.55±1.71 abcd	101.76±5.22 a	89.01±6.43 bcd	100.91±4.86 ab	95.79±2.67 abcd	100.52±2.60 abc	87.86±5.92 d	88.63±2.32 cd

مقادیر، میانگین سنجش‌ها با سه تکرار ± انحراف معیار هستند. <sup>a,b,c,d</sup> داده‌های موجود در هر ردیف با رونوشت‌های متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ( $P < 0.05$ ).

The data are represented as the mean ± standard deviation with three replicates. a,b,c,d, the data in each row indicate significant differences with different transcripts ( $P < 0.05$ )

بدست آمده در این مطالعه نشان داد که هر دو نمونه جدایه M17 و لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ رنگ زرد را نشان دادند که تأییدی بر ایمن بودن این باکتری‌ها می‌باشد. در این آزمایش رنگ مربوط به نمونه کنترل مثبت (باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳ ATCC) نارنجی متمایل به قرمز گزارش شد.

درصد خود انبوهش برای جدایه مورد مطالعه و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به ترتیب ۲۴/۳۸ و ۲۵/۲۸ بعد از ۶ ساعت برآورد گردید که از لحاظ آماری تفاوت معنی داری بین نمونه شاهد و جدایه M17 وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). بررسی پارامترهای خود انبوهش و هم انبوهش نشان از توانایی مناسب سویه M17 در مهار کرونوباکتر ساکازاکی داشت (جدول ۲). ما از لاکتوباسیلوس رامنوسوس LGG به عنوان کنترل مثبت استفاده کردیم که بالاترین توانایی خود انبوهش را نشان داد (۳۲٪). آنالیز آماری بین دو سویه M17 و LGG نشان از تفاوت معنی دار آماری ندارد ( $P > 0.05$ ). بنابراین سویه M17 دارای ویژگی‌های خودانبوهش و هم انبوهش مشابه با سویه استاندارد LGG است.

بهترین درصد زنده مانى برای هر دو گونه شاهد و تیمار در pH برآورد گردید. تفاوت معنی داری بین دو گونه مورد مطالعه در pH وجود نداشت ( $P > 0.05$ ) و حتی تکثیر جزئی نیز در این pH صورت پذیرفت. پس از ۱۲۰ دقیقه حضور در pH = ۲/۵، درصد زنده مانى لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ بیشتر از سویه M17 برآورد گردید ولی این تفاوت معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ). طبق استاندارد ملی ایران ۱۹۴۵۹، پس از آزمون مقاومت به شیر معده، تعداد شمارش شده نباید کمتر از  $10^6$  باشد (Iranian National Standard No. 19459. 2014). پس از ۴ ساعت حضور باکتری‌ها در pH = ۸، جدایه M17 درصد زنده‌مانى بالاتری از لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۸۰۱۴ را نشان داد که این اختلاف پس از انتقال از pH = ۴ معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۱). این نتایج تأییدی بر مقاومت مناسب جدایه M17 نسبت به شرایط دستگاه گوارش است. آزمایش هیدرولیز ال-آرژنین به منظور بررسی ایمنی جدایه M17 برای نوزادان انجام شد. این آزمایش کیفی با تغییر رنگ از زرد تا نارنجی متمایل به قرمز باکتری‌های ایمن را از غیر ایمن تفکیک می‌نماید. نتایج

جدول ۲- درصد خود انبوهش و هم انبوهش سویه‌های M17 و LGG با کرونوباکتر ساکازاکی

Table 2- Percentage of auto-aggregation and co-aggregation of M17 and LGG strains with *C. sakazakii*

سویه Strain	خود انبوهش پس از ۶ ساعت Auto-aggregation after 6 h (%)	هم انبوهش با کرونوباکتر ساکازاکی پس از ۶ ساعت Co-aggregation after 6 h (%)
M17	24.38 ± 4.56 <sup>a</sup>	18.09 ± 1.96 <sup>a</sup>
لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014 <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	25.28 ± 4.06 <sup>a</sup>	13.22 ± 1.92 <sup>b</sup>
LGG	32.00 ± 1.40 <sup>a</sup>	21.71 ± 1.72 <sup>a</sup>

مقادیر، میانگین سنجش‌ها با سه تکرار ± انحراف معیار هستند. <sup>a,b</sup> داده‌های موجود در هر ستون با رونوشت‌های متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند ( $P < 0.05$ ).

The data are represented as the mean ± standard deviation with three replicates. a,b, the data in each row indicate significant differences with different transcripts ( $P < 0.05$ ).

MIC کمتری نسبت به مقدار پیشنهادی توسط رهنمود EFSA (2008) نشان داد. با این حال سویه M17 در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین و کلیندامایسین از خود مقاومت نشان داد. مقدار اسید لاکتیک تولید شده برای لاکتوباسیلوس پلانتروم ۸۰۱۴ ATCC ۱/۳۱ ± ۱/۹۷، برای سویه LGG ۱۳/۹۹ ± ۰/۵۱ و برای نمونه M17 برابر ۱۴/۵۴ ± ۰/۹۷ گرم در لیتر می‌باشد. هر دو نوع اسید لاکتیک D و L در نمونه‌های مورد بررسی تولید گردید (جدول ۴).

به روزرسانی معیارهای ارزیابی مقاومت باکتریایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در انسان و حیوانات بسیار حائز اهمیت است. از این رو، پانل آنتی‌بیوتیکی (EFSA J 732:1-15) برای افزودنی‌ها و یا مواد غذایی مورد استفاده در دام ایجاد شده است (European Food Safety Authority, 2008). برای آزمون، آنتی‌بیوتیک‌های آمپی سیلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین، و کلرامفنیکل استفاده می‌شود. نتایج مقادیر آزمون MIC برای حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های لاکتوباسیلوس در برابر ۱۰ آنتی‌بیوتیک آزمایش شده در جدول ۳ آورده شده است. سویه مرجع مقادیر

جدول ۳- تعیین میزان حساسیت باکتری‌های لاکتوباسیلوس پلانتروم مرجع و M17 در برابر آنتی‌بیوتیک

Table 3- Antibiotic sensitivity of reference strain *L. plantarum* and M17 ANTIBIOTIC [MIC (μg/ML)]

سویه Strain	آمپی سیلین AMP	جنتامایسین GEN	کانامایسین CAN	اریترومایسین ERY	کلیندامایسین CLI	تتراسایکلین TET	کلرامفنیکول CHL
نقطه انفصال *breakpoint	2	16	64	1	2	32	8
لاکتوباسیلوس <i>L. plantarum</i> ATCC 14917	0.25	<4	64	0.25	1	16	8
M17	0.5	16	128	0.5	4	16	8

\* مقادیر توصیه شده EFSA لاکتوباسیلوس پلانتروم هتروفرماتیو استاندارد ارائه شده است.

\*Values are according to EFSA recommendations for heterofermentative *L. plantarum* strains

جدول ۴- مقدار اسیدهای لاکتیک تولید شده به تفکیک برای نمونه‌های مرجع و M17

Table 4- Lactic acid isomers produced by reference strain and M17

سویه Strain	D-لاکتیک اسید D-lactic acid		L-لاکتیک اسید L-lactic acid		لاکتیک اسید کل Total lactic acid
	%	گرم در لیتر g/L	%	گرم در لیتر g/L	گرم در لیتر g/L
M17	53.70	7.80 ± 0.64	46.30	6.73 ± 0.34	14.54 ± 0.99
لاکتوباسیلوس پلانتروم ۸۰۱۴ ATCC 8014	16.89	0.33 ± 0.02	83.11	1.64 ± 0.29	1.97 ± 0.31
LGG	12.07	1.67 ± 1.06	87.93	12.30 ± 0.44	13.99 ± 0.51

مطابق الزامات ایمنی EFSA، نمونه M17 و مرجع فاقد فعالیت بتاهمولتیک بودند، در حالی که نمونه کنترل مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ فعالیت همولتیکی را نشان داد. بررسی چگونگی اتصال به موسین نیز تایید کرد که سویه M17 چسبندگی کمتری (۱/۱۴ ± ۱۲/۱۰٪) نسبت به لاکتوباسیلوس پلانتروم ۸۰۱۴ ATCC (۲/۳۰ ± ۱۳/۳۳٪) و LGG (۲/۰۶ ± ۱۵/۹۳٪) دارد، هرچند که از لحاظ آماری این اختلاف‌ها معنی‌دار نبودند (P > ۰/۰۵). با این حال، میزان چسبندگی در نمونه کنترل مثبت (۲۵/۱۹ ± ۴/۴۰) برآورد گردید که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با سایر سویه‌ها دارد (P < ۰/۰۵) (جدول ۵).

تولید آمین‌های بیوژنیک توسط باکتری‌های اسید لاکتیک خاصیت مطلوبی نیست و تنها ایزوله‌های منفی به عنوان پروبیوتیک مناسب هستند. نتایج این بخش نشان داد که علی‌رغم مثبت شدن نتایج آزمون باکتری‌های لاکتوباسیلوس پارابوچنری KUH8 (تولید کننده هیستامین) و لاکتوباسیلوس برویس CECT ۴۱۲۱ (تولید کننده تیرامین) که در این مطالعه به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند، نمونه لاکتوباسیلوس پلانتروم مرجع و ایزوله M17 در محیط کشت، پیش‌سازهای آمین بیوژنیک را تولید نکردند (شکل ۲).

CaCo-2 بود (جدول ۷). سویه LGG درصد بازدارندگی بالاتری را با روش حذف نشان داد، و سویه M17 با روش جایابی کمترین درصد بازدارندگی را داشت. با این حال، آنالیز آماری نتایج، تفاوت معنی داری بین دو سویه با روش بازدارندگی یکسان نشان نمی‌دهد ( $P > 0.05$ ). از این رو، عملکرد M17 مشابه با پروبیوتیک استاندارد LGG می‌باشد. بررسی بازدارندگی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک M17 و LGG در سه روش مهار، رقابت و جابه‌جایی توانایی سویه‌های مورد مطالعه در کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به موسین را نمایش داد (جدول ۸). آنالیز آماری نتایج تفاوت معنی‌داری بین سویه M17 و سویه استاندارد LGG نشان نمی‌دهد ( $P > 0.05$ ). از این رو، عملکرد M17 مشابه با پروبیوتیک استاندارد LGG می‌باشد.

یکی دیگر از الزامات ایمنی EFSA، بررسی چسبندگی باکتری به سلول‌های CaCo-2 است. نتایج به دست آمده از این آزمون نشان داد که ایزوله بررسی شده در این مطالعه، در مقایسه با کنترل مثبت، به شکل معنی‌داری درصد چسبندگی کمتری ( $1/41 \pm 6/8$ ) با سلول‌های CaCo-2 داشت ( $P < 0.05$ ). این مقدار برای نمونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم مرجع ( $3/53 \pm 13/77$ ) و نمونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم PCC ( $7/54 \pm 21/6$ ) برآورد گردید (جدول ۶).

بررسی بازدارندگی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک M17 و LGG در سه روش حذف، رقابت و جابه‌جایی نشان از توان سویه‌های مورد مطالعه در کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های

جدول ۵- درصد چسبندگی سویه M17 و سویه‌های مرجع به موسین

Table 5- Mucin adhesion of M17 and reference strains

سویه Strain	M17	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014 <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	اشرشیا کلی <i>E. coli</i> K12
چسبندگی به موسین (%) Mucin adhesion	12.10 ± 1.14 <sup>b</sup>	13.33 ± 2.30 <sup>b</sup>	25.19 ± 4.40 <sup>a</sup>

جدول ۶- درصد چسبندگی سویه M17 و سویه‌های مرجع به سلول‌های CaCo-2

Table 6- Caco-2 adhesion of M17 and reference strains

سویه Strain	M17	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014 <i>L. plantarum</i> ATCC 8014	لاکتوباسیلوس فرمنتوم <i>L. fermentum</i> PCC
چسبندگی به سلول‌های CaCo-2 (%) CaCo-2 adhesion	6.8 ± 1.41 <sup>b</sup>	13.77 ± 3.53 <sup>ab</sup>	21.6 ± 7.54 <sup>a</sup>

جدول ۷- درصد کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به سلول‌های CaCo-2 تحت تأثیر سویه‌های M17 و LGG

Table 7- Reduction of *C. sakazakii* adhesion to CaCo-2 cells under the influence of M17 and LGG strains

روش بازدارندگی Antagonism method	حذف Exclusion	رقابت Competition	جابه‌جایی Displacement
سویه Strain	M17	± 4.60 <sup>ab</sup> 17.21	9.86 ± 5.22 <sup>b</sup>
	LGG	± 7.41 <sup>a</sup> 23.42	± 5.70 <sup>ab</sup> 15.71

جدول ۸- درصد کاهش چسبندگی کرونوباکتر ساکازاکی به موسین تحت تأثیر سویه‌های M17 و LGG

Table 8- Reduction of *C. sakazakii* adhesion to mucin under the influence of M17 and LGG strains

روش بازدارندگی Antagonism method	مهار Inhibition	رقابت Competition	جابه‌جایی Displacement
Strain	M17	14.72 ± 7.06 <sup>b</sup>	17.31 ± 3.90 <sup>b</sup>
سویه	LGG	24.47 ± 2.81 <sup>ab</sup>	35.65 ± 6.23 <sup>a</sup>



طبیعی میکروبیوتای روده را حتی زمانی که میزبان تحت درمان با آنتی بیوتیک است حفظ می‌نماید (Bacha *et al.*, 2010).

گونه‌های باکتریایی از جنس باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند L(+)-لاکتیک اسید، D(-)-لاکتیک اسید، مخلوط راسمیک DL-لاکتات یا ترکیبی از این‌ها تولید کنند (Cekola *et al.*, 2015). سویه مورد مطالعه توانایی تولید هر دو ایزومر D و L لاکتیک اسید را دارد. در انسان، اسیدوز D(-)-لاکتیک یک رویداد متابولیک نادر است که فقط در افراد مبتلا به سندرم روده کوتاه گزارش شده است (Ewaschuk *et al.*, 2005). مطالعات بالینی انجام شده در کودکان نشان می‌دهد که مصرف باکتری‌های پروبیوتیک تولیدکننده D(-)-لاکتیک اسید بی خطر است و باعث افزایش طولانی مدت D(-)-لاکتیک اسید خون نمی‌شود (Papagaroufalos *et al.*, 2014). علاوه بر این، باکتری‌های تولیدکننده D(-)-لاکتیک اسید قرن‌ها از مواد غذایی تخمیر شده مانند ماست، کلم ترش و خیارشور و اخیراً از مکمل‌های پروبیوتیک بدون علائم منفی مرتبط، توسط انسان مصرف می‌شوند (Vitetta *et al.*, 2017).

آمین‌های بیوژنیک که یکی از متابولیت‌های بیوژنیک نامطلوب باکتری‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند، باید به عنوان معیاری برای انتخاب سویه‌های پروبیوتیک استفاده شوند (Pereira *et al.*, 2001). مطالعه ما نشان داد که هیچ پتانسیل تولید آمین‌های بیوژنیک در سویه لاکتی پلانتهی باسیلوس پلانتروم آزمایش شده وجود ندارد. در تأیید نتایج ما، سویه لاکتوباسیلوس پلانترومی که به عنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک بالقوه شناسایی شده است (Noomhorm & Pianpumepong, 2010) هیچ فعالیت دکربوکسیلازی نشان نداد. مشاهدات مشابهی توسط هولزآپفل و بوور کید (Holzapfel & Bover-Cid, 1999) و ایرکیلا (Erkkilä *et al.*, 2001) با استفاده از همین گونه گزارش شده است. با این حال، برخی از محققین در مورد سویه‌های لاکتوباسیلوس خاص، نتایج متفاوتی گزارش داده‌اند (Priyadarshani & Rakshit, 2011؛ Holzapfel & Bover-Cid, 1999). این امر، ماهیت اختصاصی بودن این ویژگی برای هر سویه میکروارگانیسم را نشان می‌دهد. همان‌طور که توسط اوزگول (Özogul, 2007) گزارش شده است، تولید آمین‌ها می‌تواند در میان گونه‌های باکتریایی یک خانواده و حتی بین سویه‌های یک گونه باکتری متفاوت باشد. بنابراین، به وضوح مشهود است که برای جلوگیری از تولید آمین‌های بیوژنیک و کاهش خطر مسمومیت، نیاز به شناسایی و تعیین ویژگی‌های سویه‌های باکتریایی در نظر گرفته شده برای استفاده در مواد غذایی و بررسی توانایی بالقوه آنها در تولید آمین‌های بیوژنیک وجود دارد.

بنابراین، باید سنجش چسبندگی در شرایط برون تنی یا درون تنی برای اثبات توانایی چسبندگی انجام شود. هم انبوهش، تجمع سلول‌های باکتریایی است که از نظر ژنتیکی متمایز هستند (Grady *et al.*, 2011). این ویژگی در جلوگیری از چسبیدن پاتوژن‌ها به مخاط روده مهم است (Botes *et al.*, 2008). علاوه بر این، از طریق هم انبوهش، باکتری‌های اسید لاکتیک ترکیبات ضد میکروبی را در مجاورت با پاتوژن‌ها ترشح می‌کند که مانع بقای آنها در دستگاه گوارش می‌شود (Li *et al.*, 2015). از نتایج، به نظر می‌رسد که LGG، در مهار کرونوباکتر ساکازاکی موثرتر از M17 باشد. به طور کلی، سویه‌های چسبنده تر، درصد هم انبوهش بالاتری را نشان می‌دهند. هم انبوهش مشاهده شده با کرونوباکتر ساکازاکی با نتایج سایر محققان مطابقت دارد (Collado *et al.*, 2008a).

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک ذاتی است و مکانیسم‌های درگیر عبارتند از عدم وجود هدف، نفوذپذیری کم، غیرفعال‌سازی آنتی‌بیوتیک و وجود مکانیسم‌های خروجی (Radulović *et al.*, 2012). مقاومت مکرر لاکتیک اسید باکتری‌ها به آمینوگلیکوزیدها و لینکوزامیدها توسط مطالعات مختلف گزارش شده است (Byakika *et al.*, 2020). اگرچه مقاومت به تتراسایکلین شایع ترین مقاومت اکتسابی گزارش شده در ایزوله‌های لاکتوباسیلوس با منشأ غذایی است، اما ایزوله مورد مطالعه ما نسبت به تتراسایکلین حساس نبود. نتایج این مطالعه، سایر مطالعات را تأیید می‌کند که نشان دهنده شیوع گسترده مقاومت آنتی‌بیوتیکی در جدایه‌های غذایی لبنی است که تا حدی ناشی از استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در چند سال گذشته در حیوانات و انسان‌ها است (Pesavento *et al.*, 2014). نگرانی‌هایی وجود دارد که برخی از لاکتیک اسید باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ممکن است مخازن ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی باشند که قادر به انتقال به پاتوژن‌ها باشند (Mathur & Singh, 2005). با این حال، با مقاومت ذاتی، خطر انتقال ژن‌های مقاومت نه تنها بر اساس حدس و گمان، بلکه عملاً غیرممکن است (Radulović *et al.*, 2012). به عنوان مثال، تصور می‌شود که مقاومت لاکتوباسیلوس‌ها در برابر آمینوگلیکوزیدهایی مانند کانامایسین ذاتی است (Hummel *et al.*, 2007). مقاومت لاکتیک اسید باکتری‌ها به کانامایسین و کلیندامایسین در منابع دیگر نیز گزارش شده است (Mathara *et al.*, 2008). حساسیت سویه‌های ارزیابی شده در این مطالعه به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مانند اریترومایسین، آمپی سیلین و کلرامفنیکل نیز در مطالعات پیشین گزارش شده است (Abushelaibi *et al.*, 2017). مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌تواند یک ویژگی مطلوب باشد زیرا بقای آنها را تضمین می‌کند و در نتیجه تعادل



رقابت بیشترین درصد بازدارندگی چسبندگی به موسین را نشان داد. هر دو سویه با روش جابجایی کمترین توانایی بازدارندگی چسبندگی به سلول‌های Caco-2 و موسین را داشتند. این نتایج حاکی از آن است که بازدارندگی چسبندگی می‌تواند با چسبنده‌ها و گیرنده‌های اختصاصی پروبیوتیک و پاتوژن برای آن با هم رقابت کنند (Lee & Puong, 2002) یا با عوامل دیگری مانند هم انبوهش هر دو سویه (Reid et al., 1988) مرتبط باشد. طبق نتایج ما می‌توان اظهار کرد که به‌ویژه هم انبوهش بین *کرونوباکتر ساکاراکی* و سویه‌های *لاکتوباسیلوس* می‌تواند در کاهش چسبندگی پاتوژن به موسین نقش داشته باشد و این ویژگی می‌تواند برای غربال‌گری پروبیوتیک‌های خاص برای استفاده در شیرخشک نوزادان استفاده شود.

این مطالعه اختصاصیت بسیار بالایی را در بازدارندگی چسبندگی *کرونوباکتر ساکاراکی* توسط سویه مورد مطالعه گزارش می‌کند که نشان‌دهنده نیاز به شناسایی موردی سویه‌های پروبیوتیک است. چنین مطالعاتی امکان انتخاب سویه‌هایی را با کاربرد بالقوه در پیشگیری یا درمان عفونت‌های گوارشی خاص فراهم می‌کند. این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌ها باید بر اساس کاربرد مورد نظرشان انتخاب شوند، زیرا اختصاصیت عمل یک سویه خاص ممکن است بسیار بالا باشد. انتخاب پروبیوتیک‌هایی که یک پاتوژن خاص را مهار یا جابجا می‌کنند، رویکرد منطقی برای پیشگیری یا درمان عفونت ناشی از آن پاتوژن خواهد بود. با این حال، باید در نظر گرفت که مطالعات درون تنی برای تأیید چنین تأثیرات بالقوه ای ضروری است.

### نتیجه‌گیری

سویه‌های *لاکتیک اسید باکتری* با توانایی قابل قبول برای چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال می‌توانند برای استقرار در روده مناسب باشند. آنها می‌توانند به عنوان مانعی برای مبارزه با پاتوژن‌ها از طریق مکانیسم‌های رقابتی مختلف، مانند هم انبوهش با پاتوژن‌ها و چسبندگی عمل کنند. سویه M17 پروفایل ایمنی و ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسبی دارد زیرا فعالیت تداخلی قابل قبولی در مقابل *کرونوباکتر ساکاراکی* نشان می‌دهد.

همولیز یکی از عوامل مهم بیماری‌زایی در باکتری‌های پاتوژن است، و از این رو، یکی از جنبه‌های ایمنی سویه مورد مطالعه، آزمایش برون تنی برای فعالیت همولیتیک در نظر گرفته شده است. در تحقیق حاضر، جدایه M17 باعث همولیز آلفا یا بتا نشد، علی‌رغم این که همولیز آلفا در بین *لاکتوباسیلوس*‌های با منشأ غذایی و محصولات لبنی غیرمعمول نیست (Kaktcham et al., 2012).

پروبیوتیک‌ها باید ابتدا خود را به اپی‌تلیوم روده بچسبانند تا بتوانند مزایای سلامتی را برای میزبان خود به ارمغان آورند (Chou & Weimer, 2012). چسبندگی تا حدی آنها را قادر می‌سازد تا در برابر حرکات لوله گوارش مقاومت کنند (Tomáška et al., 2015). علاوه بر این، چسبندگی پروبیوتیک‌ها موجب جابجایی پاتوژن‌ها از سطح مشترک مجرای مخاطی از طریق رقابت برای مکان‌های اتصال در سطوح اپی‌تلیال و/یا مخاطی می‌شود (Veerappan et al.; Collado et al., 2007). مطالعات همچنین گزارش داده اند که چسبندگی برخی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بر روی اپی‌تلیوم روده باعث ایجاد پاسخ‌های ایمنی خاص می‌شود. اتصال پروبیوتیک‌ها همچنین می‌تواند عملکرد سد روده<sup>۱</sup> را بهبود بخشد و نفوذپذیری آن را در برابر پاتوژن‌ها و آنتی‌ژن‌ها کاهش دهد (Caballero-Franco et al., 2007). علاوه بر این، اتصال آنها به روده می‌تواند باعث تحریک ترشح ترکیبات ضد میکروبی توسط سلول‌های اپی‌تلیال روده شود (Veerappan et al., 2012). ما در این مطالعه چسبندگی *لاکتیک پلانسی باسیلوس پلانسیا* سویه M17 و همچنین توانایی آن در بازدارندگی چسبندگی *کرونوباکتر ساکاراکی* به موسین و سلول‌های Caco-2 را آزمایش کردیم. مقادیر چسبندگی در محدوده ای بود که قبلاً برای *لاکتوباسیلوس*‌ها گزارش شده بود (Collado et al., 2007).

توانایی حذف یا جابجایی پاتوژن‌ها از موسین و سلول‌های روده توسط سایر *لاکتوباسیلوس*‌های پروبیوتیک قبلاً گزارش شده است (Sherman et al., 2005). به نظر می‌رسد توانایی بازدارندگی چسبندگی پاتوژن‌ها هم به *لاکتوباسیلوس*‌ها و هم به پاتوژن آزمایش شده بستگی دارد که نشان‌دهنده اختصاصیت بسیار بالا است. سویه LGG با روش حذف، مؤثرترین روش بازدارنده چسبندگی *کرونوباکتر ساکاراکی* به سلول‌های Caco-2 بود، در حالی که همین سویه با روش

### منابع

1. Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., & Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT—Food Science and Technology*, 79, 316–325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>
2. Agostoni, C., Axelsson, I., Goulet, O., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Puntis, J.W.L., Rigo, J., Shamir, R., Szajewska, H., Turck, D., Vandenplas, Y., & Weaver, L.T. (2004). Preparation and handling of powdered infant

- formula: a commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39, 320–322. <https://doi.org/10.1097/00005176-200410000-00002>
3. Arboleya, S., González, S., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., de los Reyes-Gavilán, C.G., & Gueimonde, M. (2012). Development of probiotic products for nutritional requirements of specific human populations. *Engineering in Life Sciences*, 12, 368–376. <https://doi.org/10.1002%2Felsc.201100129>
  4. Aristoy, M.C., & Toldrá, F. (2012). Essential Amino Acids. *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*. Boca Raton: CRC press.
  5. Azizi, F., Habibi Najafi, M.B., & Edalatian Dovom, M.R. (2017). The biodiversity of *Lactobacillus* spp. from Iranian raw milk Motal cheese and antibacterial evaluation based on bacteriocin-encoding genes. *AMB Expr*, 7, 176. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0474-2>
  6. Bacha, K., Mehari, T., & Ashenafi, M. (2010). Antimicrobial susceptibility patterns of LAB isolated from Wakalim, a traditional Ethiopian fermented sausage. *Journal of Food Safety*, 30, 213–223. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00201.x>
  7. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., & Brooks, H.L. (Eds.). (2018). *Ganong's Review of Medical Physiology*, 25e. McGraw Hill.
  8. Bassyouni, R.H., Abdel-All, W. S., Fadl, M.G., Abdel-All, S., & Kamel, Z. (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. *Life Science Journal*, 9, 2924–2933.
  9. Bengoa, A.A., Zavala, L., Carasi, P., Trejo, S.A., Bronsoms, S., Serradell, M.L.Á., Garrote, G.L., & Abraham, A.G. (2018). Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. *Food Research International*, 103, 462–467. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.093>
  10. Blackburn, S. (2016). *Maternal, Fetal, & Neonatal Physiology: A Clinical Perspective*. Saunders Elsevier.
  11. Botes, M., Van Reenen, C.A., L. & Dicks, M.T. (2008). Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.016>
  12. Bover-Cid, S., & Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33–41. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00152-x](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00152-x)
  13. Bowen, A.B., & Braden, C.R. (2006). Invasive *Enterobacter sakazakii* disease in infants. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1185–1189. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1208.051509>
  14. Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W., & Newman, S.M. (1997). The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(3). <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>
  15. Byakika, S., Mukisa, I.M., Byenkya, Y., & Muyanja, C. (2020). Probiotic potential of lactic acid starter cultures isolated from a traditional fermented sorghum-millet beverage. *International Journal of Microbiology*, <https://doi.org/10.1155/2020/7825943>
  16. Caballero-Franco, C., Keller, K., De Simone, C., & Chadee K. (2007). The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 292, 315–322. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00265.2006>
  17. Campana, R., van Hemert, S., & Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0162-4>
  18. Cekola, P.L., Czerkies, L.A., Storm, H.M., Wang, M.H., Roberts, J., & Saavedra, J.M. (2015). Growth and tolerance of term infants fed formula with probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Clinical Pediatrics*, 54(12), 1175–84. <https://doi.org/10.1177/0009922815574076>
  19. Charchohghyan, H., Kwon, H., Hwang, D.J., Lee, J.S., Lee, J., & Kim, M. (2016). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er2 317/402. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(5), 635–640. <https://doi.org/10.5851%2Fkosfa.2016.36.5.635>
  20. Chou L.S., & Weimer, B. (1999). Isolation and characterization of acid- and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science*, 82, 23–31. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(99\)75204-5](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(99)75204-5)
  21. CODEX Alimentarius Commission. (2008). *Cac/rcp 66-2008 Code of Hygienic Practice for Powdered Infant Formula for Infants and Young Children*. Joint FAO/WHO food standards programme. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

22. Collado, M.C., Isolauri, E., & Salminen, S. (2008a). Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 285, 58–64. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01211.x>
23. Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, 45(4), 454–60. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02212.x>
24. Collado, M.C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008b). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European Food Research and Technology*, 226, 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
25. de Carvalho, K.G., Kruger, M.F., Furtado, D.N., Todorov, S.D., & de Melo Franco, B.D.G. (2009). Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures of *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic *in vitro* model. *Annals of Microbiology*, 59(3), 439–445. <https://doi.org/10.1007/BF03175128>
26. Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., & Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, 31, 438–442. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00845.x>
27. Drudy, D., Mullane, N.R., Quinn, T., Wall, P.G., & Fanning, S. (2006). *Enterobacter sakazakii*: An emerging Pathogen in Powdered Infant Formula. *Clinical Infectious Diseases*, 42, 996–1002. <https://doi.org/10.1086/501019>
28. Erickson, T., Ahrens, W.R., Aks, S., Baum, C., & Ling, L. (2005). *Pediatric Toxicology: Diagnosis and Management of the Poisoned Child*. New York: McGraw-Hill.
29. Erkkilä, S., Petäjä, E., Eerola, S., Lilleberg, L., Mattila-Sandholm, T., & Suihko, M.L. (2001). Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. *Meat Science*, 58, 111–116. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(00)00135-2)
30. European Food Safety Authority. (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antimicrobials of human or veterinary importance. *EFSA Journal*, 732, 1–15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.732>
31. Ewaschuk, J.B., Naylor, J.M., & Zello, G.A. (2005). D-lactate in human and ruminant metabolism. *The Journal of Nutrition*, 135(7), 1619–25. <https://doi.org/10.1093/jn/135.7.1619>
32. FAO. (2007). *Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
33. FAO/WHO. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report on joint FAO/WHO expert consultation, Córdoba, Argentina. [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/en/probiotics.pdf?ua=1](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf?ua=1)
34. FAO/WHO. (2006a). Expert meeting on *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy.
35. FAO/WHO. (2006b). Probiotics in food; Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, Italy.
36. Farmer, J.J., Asbury, M.A., Hickman, F.W., & Brenner, D.J. (1980). The Enterobacteriaceae study group *Enterobacter sakazakii*: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 569–584. <https://doi.org/10.1099/00207713-30-3-569>
37. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Muñoz-Quezada, S., & Gil, A. (2013). Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *British Journal of Nutrition*, 109, 35–50. <https://doi.org/10.1017/s0007114512004011>
38. Food Safety Authority of Ireland. (2011). *Guidance Note No. 18: Validation of Product Shelf-Life* (Revision 1); Dublin, Ireland.
39. Grady Jr, C.L., Daigger, G.T., Love, N.G., & Filipe, C.D. (2011). *Biological Wastewater Treatment*, CRC Press, Boca Raton, FL, USA. <https://doi.org/10.1201/b13775>
40. Grodner, M., Escott-Stump, S., & Dorner, S. (2021). *Nutritional Foundations and Clinical Applications A Nursing Approach*.
41. Guarner, F., & Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237–238. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(97)00136-0)
42. Gurtler, J.B., Kornacki, J.L., & Beuchat, L.R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 1–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.013>
43. Holý, O., & Forsythe, S. (2014). *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *Journal of Hospital Infection*, 86, 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.011>

44. Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., & Franz, C.M.A.P. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 730–739. <https://doi.org/10.1128/aem.02105-06>
45. Hunter, C.J., Williams, M., Petrosyan, M., Guner, Y., Mittal, R., Mock, D., Upperman, J.S., Ford, H.R., & Prasadarao, N.V. (2009). *Lactobacillus bulgaricus* prevents intestinal epithelial cell injury caused by *Enterobacter sakazakii*-induced nitric oxide both *in vitro* and in the newborn rat model of necrotizing enterocolitis. *Infection and Immunity*, 77(3), 1031-1043. <https://doi.org/10.1128/iai.01192-08>
46. Iranian National Standard No. 19459. (2014). *Probiotic microorganisms specifications and test methods*. Iranian Standards and Industrial Research Institute, Tehran.
47. Jose, N., Bunt, C., & Hussain, M. (2015). Comparison of microbiological and probiotic characteristics of lactobacilli isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms*, 3, 198–212. <https://doi.org/10.3390/microorganisms3020198>
48. Kaktcham, N.F., Zambou, F.M., El-Soda, T.M., & Choudhary, M.I. (2012). Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. *Scientia Pharmaceutica*, 80, 189–203. <https://doi.org/10.3797/scipharm.1107-12>
49. Kent, R.M., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., & Ross, R.P. (2015). Novel approaches to improve the intrinsic microbiological safety of powdered infant milk formula. *Nutrients*, 7, 1217-1244. <https://doi.org/10.3390%2Fnu7021217>
50. Kos, B., Suskovic, J., Goreta, J., & Matosic, S. (2000). Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 121-127.
51. Lai, K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children and adults. *Medicine*, 80, 113-122. <https://doi.org/10.1097/00005792-200103000-00004>
52. Lee, Y.K., & Puong, K.Y. (2002). Competition for adhesion between probiotics and human gastrointestinal pathogens in presence of carbohydrate. *British Journal of Nutrition*, 88, 101–108. <https://doi.org/10.1079/bjn2002635>
53. Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 3, 84–92.
54. Liong, M.T., & Shah N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55–66. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(05\)72662-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(05)72662-x)
55. Liu, W., Chen, M., & Duo, L. (2020). Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. *Journal of Dairy Science*, 103, 4013–4025. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17602>
56. Mathara, J., Schillinger, U., & Guigas, C. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.027>
57. Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
58. Mohan Nair, M.K., Venkitanarayanan, K., Silbart, L.K., & Kim, K.S. (2009). Outer Membrane Protein A (OmpA) of *Cronobacter sakazakii* Binds Fibronectin and Contributes to Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(4), 495-501. <https://doi.org/10.1089/fpd.2008.0228>
59. Møller, C.O.A., Ücok, E.F., & Rattray, F.P. (2020). Histamine forming behaviour of bacterial isolates from aged cheese. *Food Research International*, 128, 108719. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108719>
60. Muñoz-Quezada, S., Chenoll, E., Vieites, J.M., Genovés, S., Maldonado, J., Bermúdez-Brito, M., Gomez-Llorente, C., Matencio, E., Bernal, M.J., Romero, F., Suárez, A., Ramón, D., & Gil, A. (2013). Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *British Journal of Nutrition*, 109, S51–S62. <https://doi.org/10.1017/s0007114512005211>
61. Nazarowec-White, M., & Farber, J.M. (1997). *Enterobacter sakazakii*: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 34, 103-113. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01172-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01172-5)
62. Olasupo, N.A., Schillinger, U., & Holzapfel, W.H. (2001). Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. *Food Biotechnology*, 15(3), 157-167. <http://dx.doi.org/10.1081/FBT-100107627>
63. Özogul, F., & Özogul, Y. (2007). The ability of biogenic amines and ammonia production by single bacterial cultures. *European Food Research and Technology*, 225, 385-394. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0429-3>
64. Pagotto, F.J., & Farber, J.M. (2009). *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*): Advice, policy and research in Canada. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.010>



65. Papagaroufalis, K., Fotiou, A., Egli, D., Tran, L.A., & Steenhout, P. (2014). A randomized double blind controlled safety trial evaluating D-lactic acid production in healthy infants fed a *Lactobacillus reuteri*-containing formula. *Nutrition and Metabolic Insights*, 7, 19-27. <https://doi.org/10.4137/nmi.s14113>
66. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., & Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*, 65, 859-867. [https://doi.org/10.1016/s0309-1740\(02\)00292-9](https://doi.org/10.1016/s0309-1740(02)00292-9)
67. Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T. & San Romao, M.V. (2001). Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 211-216. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00534-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00534-7)
68. Pérez Martínez, G., Bäuerl, C., & Amores, M.C.C. (2012). *Selection and evaluation of probiotics*. In L. M. L. Nollet and F. Toldrá eds. Handbook of analysis of active compounds in functional foods. CRC Press; Taylor & Francis Group.
69. Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., & Lo Nostro, A. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology*, 41, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.008>
70. Pianpumepong, P. & Noomhorm, A. (2010). Isolation of probiotic bacteria from turmeric (*Curcuma longa* Linn.) and its application in enriched beverages. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 2456-2462. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02337.x>
71. Polka, J., Morelli, L., & Patrone, V. (2016). Microbiological cutoff values: A critical issue in phenotypic antibiotic resistance assessment of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. *Microbial Drug Resistance*, 24, 345-370. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0328>
72. Priyadarshani, W.M.D., & Rakshit, S.K. (2011). Screening selected strains of probiotic lactic acid bacteria for their ability to produce biogenic amines (histamine and tyramine). *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 2062-2069. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02717.x>
73. Radulović, Z., Petrović, T., & Bulajić, S. (2012). Antibiotic susceptibility of probiotic bacteria. [http://cdn.intechopen.com/pdfs/34710/InTechAntibiotic\\_susceptibility\\_of\\_probiotic\\_bacteria.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/34710/InTechAntibiotic_susceptibility_of_probiotic_bacteria.pdf)
74. Redruello, B., Ladero, V., Cuesta, I., Álvarez-Buylla, J.R., Martín, M.C., Fernández, M., & Alvarez, M.A. (2013). A fast, reliable, ultra high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of amino acids, biogenic amines and ammonium ions in cheese, using diethyl ethoxymethylenemalonate as a derivatising agent. *Food Chemistry*, 139(1-4), 1029-35. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.01.071>
75. Reid, G., McGroarty, J.A., Angotti, R., & Cook, R.L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 34, 344-351. <https://doi.org/10.1139/m88-063>
76. Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Casquete, R., Serradilla, M.J., & Córdoba, M.d.G. (2009). Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. *Meat Science*, 83, 460-467. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.06.027>
77. Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., & Tompkins, T.A. (2005). Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infection and Immunity*, 73, 5183-5188. <https://doi.org/10.1128/iai.73.8.5183-5188.2005>
78. Singhal, K., Joshi, H., & Chaudhary B.L. (2010). Bile and acid tolerance ability of probiotic *Lactobacillus* strains. *Journal of Global Pharma Technology*, 2, 17-25.
79. Srimahaeak, T., Bianchi, F., Chlumsky, O., Larsen, N., & Jespersen, L. (2021). *In-vitro* study of *Limosilactobacillus fermentum* PCC adhesion to and integrity of the Caco-2 cell monolayers as affected by pectins. *Journal of Functional Foods*, 79. <https://doi.org/104395.10.1016/j.jff.2021.104395>
80. Tomás, M.S.J., Wiese, B., & Nader-Macías, M.E. (2005). Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 1383-1391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02726.x>
81. Tomáška, M., Drončovský, M., Klapáčová, L., Slotťová, A., & Kološta, M. (2015). Potential probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from goat's milk. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 9(1), 66-71. <https://doi.org/10.5219/434>
82. Veerappan, G.R., Betteridge, J., & Young, P.E. (2012). Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, 14, 324-333. <https://doi.org/10.1007/s11894-012-0265-5>
83. Vitetta, L., Coulson, S., Thomsen, M., Nguyen, T., & Hall, S. (2017). Probiotics, D-Lactic acidosis, oxidative stress and strain specificity. *Gut Microbes*, 4, 311-322. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1279379>