مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوازدهم، شماره 3، پاییز 1396، صفحات 98-89

ارزیابی خواص ضد میکروبی *پدیوکوکوس استیلسی* جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو

مریم خشایی[1]، علیرضا صادقی[2]، مرتضی خمیری[3]، مهدی کاشانی‌نژاد[4]، علیرضا صادقی ماهونک[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
2- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghi.gau@gmail.com
3- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
4- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: 95/3/14 تاریخ پذیرش: 95/7/4

چکیده

سابقه و هدف: اکوسیستم‌های تخمیری غیر اسپتیک نظیر خمیرترش، جایگاه مناسبی برای باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خصوصیات ضد میکروبی به شمار می‌آیند. این مطالعه با هدف ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی یکی از جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو در برابر برخی از شاخص‌های میکروبی ناشی از مواد غذایی به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی پس از شناسایی مولکولی جدایه لاکتیکی، خاصیت ضد میکروبی جدایه مذکور و همچنین پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن بر اساس روش‌های انتشار در دیسک و ریز رقت (ضد باکتریایی) و همچنین کشت دو لایه و لکه‌گذاری سوسپانسیون اسپور (ضد قارچی) بررسی گردید. نتایج این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: توالی‌یابی محصولات PCR، منجر به شناسایی *پدیوکوکوس استیلسی* به عنوان جدایه لاکتیکی خمیرترش آرد جو شد. نتایج ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی نیز حاکی از بروز بیشترین فعالیت آنتاگونیستی این جدایه و همچنین پالیده خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی آن بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* در مقایسه با سایر شاخص‌های باکتریایی بود ($p<0/05$). علاوه بر این، مشخص شد که *پدیوکوکوس استیلسی* و پالیده‌های کشت آن از قابلیت ضد قارچی مناسبی بر علیه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* برخوردار هستند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش، می‌توان از جدایه *پدیوکوکوس استیلسی* و پالیده‌های کشت آن به عنوان نگهدارنده زیستی در کنترل رشد برخی از شاخص‌های میکروبی در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *پدیوکوکوس استیلسی*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *باسیلوس سوبتیلیس*، فعالیت ضد میکروبی

• مقدمه

استفاده از خمیرترش در فرآوری نان، یکی از قدیمی‌ترین فرآیندهای زیست فناوری در تولید مواد غذایی محسوب می‌شود که پیدایش آن به مصر باستان و به 3000 سال قبل از میلاد برمی‌گردد (1). خمیرترش یک سیستم بیولوژیکی پیچیده از آرد غلات یا اجزاء آن و آب است که اساس تشکیل آن همزیستی بین باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در بهبود خواص نانوایی، تغذیه‌ای، سلامتی‌بخش، حسّی و ماندگاری نان ایفا می‌کنند (2).

باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم‌ترین باکتری‌های موجود در انواع خمیرترش مطرح هستند (3). این باکتری‌ها با داشتن خاصیت ضد میکروبی نه تنها سبب کاهش رشد و گسترش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد می‌شوند بلکه می‌توانند متابولیت‌ها و سموم تولید شده توسط آن‌ها را نیز بی‌اثر کنند (4). فعالیت ضد میکروبی این باکتری‌ها ناشی از تولید انواع مواد بازدارنده نظیر اسیدهای آلی (اسید لاکتیک و اسید استیک)، ترکیبات اکسیژن‌دار همچون پراکسید هیدروژن، ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین‌ها، پپتیدهای

دارای وزن مولکولی پایین و پروتئین‌های ضد قارچی است (5). امروزه استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها در پیش‌گیری از مسمومیت‌ها و فساد مواد غذایی و همچنین افزایش ماندگاری محصولات غذایی خصوصاً فراورده‌هایی که غنی از مواد مغذی و ویتامین‌ها هستند بسیار رایج شده است. از سوی دیگر با افزایش مقاومت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد در مقابل آنتی‌بیوتیک‌ها و عوارض ناشی از مصرف نگهدارنده‌های شیمیایی، این دسته از باکتری‌ها می‌توانند نقش مهمی به عنوان نگهدارنده‌های زیستی ایفا نمایند (6، 5).

تاکنون مطالعات گسترده‌ای بر روی فلور میکروبی و خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک خمیرترش صورت گرفته است. به عنوان مثال، Simsek و همکاران (2006) باکتری‌های اسید لاکتیک دارای خاصیت ضد میکروبی را از خمیرترش جدا کردند که از این بین، بهترین سویه‌های دارای قابلیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس‌های برویس* (*Lactobacillus brevis*)، *دلبروکی* (*L. delbrueckii*)، *وریدنسیس* (*L. viridance*) و همچنین *پدیوکوکوس* (*Pediococcus*) بودند (7). Mentes و همکاران (2007) نیز فعالیت ممانعت کنندگی *لاکتوباسیلوس‌های پلانتاروم* (*L. plantarum*) و *آلمنتاریوس* (*L. alimentarius*) جدا شده از خمیرترش را در مهار رشد سویه‌های *باسیلوس* (*Bacillus*) عامل نخی شدن نان مطالعه کردند (8). همچنین Corsetti و همکاران (2008) قابلیت تولید باکتریوسین در باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش را مورد بررسی قرار داده‌اند (9). Cizeikiene و همکاران (2013) نیز تاثیر ضد میکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سیکی* (*L. sakei*)، *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیس* (*P. acidilactici*) و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* (*P. pentosaceus*) را در مقابل انواعی از *باسیلوس*، *سودوموناس* (*Pseudomonas*)، *لیستریا* (*Listeria*)، *اشریشیا* (*Escherichia*) و قارچ‌های *فوزاریوم* (*Fusarium*)، *پنیسیلیوم* (*Penicillium*)، *آسپرژیلوس* (*Aspergillus*)، *دباریومایسز* (*Debaryomyces*) و *کاندیدا* (*Candida*) مورد مطالعه قرار داده و دریافتند که باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید ترکیباتی مانند اسیدهای آلی می‌توانند به عنوان نگهدارنده زیستی به طور گسترده‌ای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد را مهار کنند (10).

در این پژوهش پس از جداسازی و شناسایی مولکولی یکی از جدایه‌های لاکتیکی عمده موجود در خمیرترش آرد کامل جو، ویژگی‌های ضد میکروبی جدایه مذکور و پالیده‌های کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن در برابر برخی از شاخص‌های باکتریایی و قارچی مواد غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در نیمه دوم سال 1394 و در آزمایشگاه‌های دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به اجرا در آمد.

مواد: آرد جو پوشینه‌دار مصرفی در این پژوهش دارای 11/6 درصد پروتئین، 61/7 درصد کربوهیدرات و 1/9 درصد خاکستر بود. این ویژگی‌ها بر اساس روش‌های مدوّن AACC (2010) تعیین گردید (11). مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مصرفی نیز از شرکت Merk آلمان و کشت‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد استفاده شامل *اشریشیا کلی* (*Esherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1298)، *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC 1720)، *لاکتوباسیلوس* sp (*Lactobacillus* sp PTCC 1332)، *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* PTCC 5012) و *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus* PTCC 5006) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد.

تهیه خمیرترش: ابتدا 30 درصد آرد جو با آب مخلوط شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. سپس در هر روز 20 درصد از خمیرترش روز قبل به مخلوط آب و آرد تازه اضافه شده و دوباره در گرمخانه با دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت قرار داده شد. این عمل (مایه‌گیری) تا رسیدن به pH حدود 4 تکرار گردید (12).

تعیین pH و اسیدیته: برای تعیین اسیدیته قابل تیتر نمونه‌های خمیرترش (بر حسب اسید لاکتیک)، 10 گرم از آن با 90 میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط و یکنواخت شده و سپس توسط محلول سود 0/1 نرمال تا رسیدن به pH معادل 8/5 تیتر گردید. اسیدیته نیز بر حسب حجم سود مصرفی برحسب میلی‌لیتر بیان شد (13). میزان pH نمونه‌های خمیرترش نیز با pH متر (Calimatic 766، Knick، آلمان) تعیین گردید.

شمارش و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک: شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک خمیرترش به وسیله رقت‌سازی متوالی و کشت سطحی رقت‌های تهیه شده بر روی محیط

کشت MRS agar بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت انجام پذیرفت. سپس پرگنه‌های عمده، انتخاب و از آن‌ها کشت خطی تهیه گردید. در پایان بر روی پرگنه خالص به دست آمده، آزمون‌های رنگ آمیزی گرم و کاتالاز صورت گرفت و با میکروسکوپ بررسی شد (14).

استخراج DNA: استخراج DNA از تک پرگنه کشت خالص جدایه مورد نظر با استفاده از کیت استخراج DNA (K-3032، Bioneer، کره جنوبی) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

واکنش PCR: پس از استخراج DNA به منظور شناسایی جدایه لاکتیکی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دارای پرایمرهای اختصاصی

F: GAACGCGAAGAACCTTAC (5'-3') و

R:GCGTGTGTACAAGACCC (5'-3') استفاده شد. توالی هدف تکثیر، بخشی از ناحیه متغیر V6-V8 جایگاه 16S rDNA به طول 500 جفت باز بود. مقادیر واکنشگرهای PCR شامل یک واحد بافر استاندارد، مخلوطی از هر dNTP با غلظت 0/2 میلی مولار، 25 میکروگرم سرم آلبومین، Taq پلیمراز با فعالیت 2/5 واحد (Robust، فرانسه)، 25 پیکامول از هر پرایمر و DNA با غلظت 100 نانوگرم و همچنین چرخه‌های دمایی تکثیر شامل واسرشت DNA با شروع داغ در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه و سپس 35 چرخه اصلی با برنامه حرارتی 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، 61 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه، 68 درجه سانتی‌گراد به مدت 60 ثانیه و سپس تکثیر انتهایی به مدت 7 دقیقه در دمای 68 درجه سانتی‌گراد (ترموسایکلر Corbett، استرالیا) مطابق روش Ferchichi و همکاران (2007) تعیین شد. برای تأیید اولیه تکثیر، محصولات PCR به ژل آگارز 1/5 درصد واجد رنگ SYBR safe (Invitrogen، آمریکا) منتقل و در بافر TBE الکتروفورز گردید. محصول PCR برای تأیید نهایی و تعیین توالی به شرکت MWG آلمان ارسال شد (15).

تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی: بدین منظور پس از کشت جدایه لاکتیکی در محیط کشت MRS broth در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج 600 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80 Double Beam UV-Visible، PGI، انگلستان) در فواصل زمانی مشخص، منحنی رشد ترسیم گردید (16).

تعیین خواص ضد باکتریایی: به منظور ارزیابی خواص ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی از دو روش انتشار در دیسک و ریز رقت استفاده شد.

روش انتشار در دیسک: برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی فعال در برابر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *باسیلوس سوبتیلیس* به روش انتشار در دیسک، ابتدا جدایه لاکتیکی و باکتری‌های شاخص فعال‌سازی شدند. سپس جمعیت شاخص‌های باکتریایی و جدایه لاکتیکی به 1×10^8 cfu/ml رسانده شد. در ادامه باکتری‌های شاخص بر روی محیط کشت Nutrient agar به شکل سطحی کشت داده شدند. سپس دیسک‌های کاغذی استریل (پادتن طب، ایران) با فاصله معین از لبه پلیت در سطح محیط کشت حاوی باکتری‌های شاخص قرار داده شد و 40 میکرولیتر از جدایه لاکتیکی بر روی دیسک‌های کاغذی منتقل گردید. در نهایت پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت گرمخانه‌گذاری گردیدند. قطر هاله عدم رشد نیز با نرم افزار ImageJ اندازه‌گیری گردید (17).

روش ریز رقت: برای مقایسه خاصیت ضد باکتریایی پالیده‌های کشت جدایه لاکتیکی در فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن از روش ریز رقت استفاده شد. برای تهیه پالیده خام حاصل از کشت جدایه لاکتیکی، کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن با 14000 دور در دقیقه، دمای 5 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ (R 514 combi، Hanil، کره جنوبی) شد. سپس مایع رویی به دست آمده از فیلتر سرنگی (JET BIOFIL، چین) 0/22 میکرونی عبور داده شد. برای تهیه پالیده کشت خنثی شده، pH پالیده مذکور با سود یک نرمال تا pH=7 خنثی گردید. شاخص‌های باکتریایی نیز در محیط کشت Nutrient broth کشت داده شدند و جمعیت آن‌ها به 1×10^8 cfu/ml رسانده شد. نمونه کنترل منفی حاوی پالیده خام و شاخص‌های باکتریایی اتوکلاو شده، کنترل مثبت حاوی محیط کشت MRS broth و شاخص‌های باکتریایی و نمونه‌های دیگر حاوی پالیده‌های خام و یا خنثی و شاخص‌های باکتریایی بودند. در نهایت میکروپلیت به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و توسط دستگاه الایزا ریدر (Sdco، روسیه) در طول موج 620 نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت (18).

تعیین خواص ضد قارچی: برای ارزیابی خاصیت ضد قارچی جدایه لاکتیکی از روش‌های کشت‌های دو لایه و لکه‌گذاری اسپور استفاده شد.

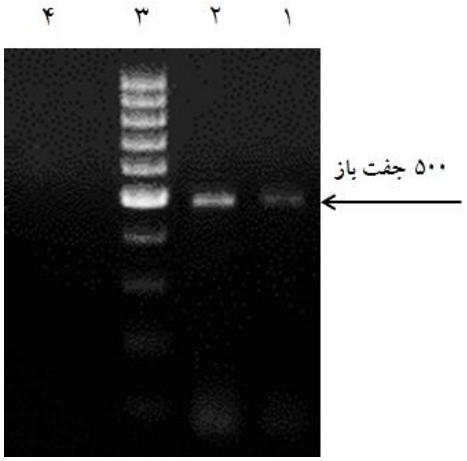
روش کشت دو لایه: ابتدا پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS agar تهیه شد و با سوآب استریل از کشت فعال جدایه لاکتیکی خطوطی به اندازه 3 سانتی‌متر با فاصله متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت‌های مذکور کشیده شد و سپس به مدت 72 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس*، پلیت‌های کشت داده شده آن‌ها در محیط YGC به مدت 7 روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. پس از گرمخانه‌گذاری، اسپورها با استفاده از آب مقطر استریل، شسته و جمع‌آوری گردیدند. شمارش اسپورها نیز با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد و اسپورها تا 10^5 عدد در هر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. سپس مخلوط حاوی یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با 9 میلی‌لیتر محیط کشت YGC agar بر روی خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی به صورت کشت دو لایه ریخته شد و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای 30 درجه سانتی‌گراد به مدت 48 ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت داده شده جدایه لاکتیکی با نرم افزار ImageJ اندازه‌گیری شد (19).

روش لکه‌گذاری اسپور: برای ارزیابی خاصیت ضد قارچی پالیده خام و خنثی شده جدایه لاکتیکی در فازهای رشد لگاریتمی و سکون از این روش استفاده شد. بدین منظور در هر پلیت 10 میلی‌لیتر از مخلوط هر یک از پالیده‌ها و YGC با نسبت 1 به 9 ریخته شد. از محیط کشت YGC agar بدون پالیده نیز به عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. در این آزمایش مرکز هر پلیت با 3 میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه شده در مرحله قبل لکه‌گذاری شد. سپس پلیت‌ها به مدت 6 روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و رشد کپک‌ها با تعیین قطر کلنی آن‌ها به صورت روزانه بررسی گردید (20).

آنالیز آماری: نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری 0/05 با سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SAS نسخه 9.1.3 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Office Excel نسخه 2007 استفاده شد.

• یافته‌ها

شناسایی جدایه لاکتیکی: پس از 4 بار تکرار فرایند مایه‌گیری خمیرترش، باکتری‌های اسید لاکتیک به روشی که قبلاً توضیح داده شد جدا شدند. نتایج آزمون‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی، گرم مثبت، کاتالاز منفی و کوکوسی بودن جدایه را مشخص کرد. همانطور که در شکل 1، نشان داده شده است الکتروفورز محصولات PCR نیز حاکی از تکثیر اختصاصی توالی هدف با طول 500 جفت باز بود. پس از مقایسه نتایج توالی‌یابی با داده‌های موجود در پایگاه NCBI و استفاده از رویه BLASTn مشخص شد که جدایه لاکتیکی، پدیوکوکوس استیلسی (*Pediococcus stilesii*) بود.



شکل 1. ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف 500 جفت باز جهت شناسایی جدایه لاکتیکی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش آرد کامل جو (لاین 1) در مجاورت مارکر صد جفت بازی (لاین 3) و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* sp (لاین 2) و کنترل منفی یا فاقد باکتری (لاین 4).

خاصیت ضد باکتریایی *پدیوکوکوس استیلسی* به روش انتشار در دیسک: بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین خاصیت ضد باکتریایی *پدیوکوکوس استیلسی* در مقابل *باسیلوس سوبتیلیس* با قطر هاله عدم رشد 14/633 میلی‌متر و کمترین مقدار آن در مقابل *اشریشیا کلی* با قطر هاله عدم رشد 7/591 میلی‌متر مشاهده شد. علاوه بر این، بین خاصیت ضد باکتریایی *پدیوکوکوس استیلسی* بر روی باکتری‌های *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* (13/404 میلی-متر) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (9/096 میلی‌متر) تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). اما بین خاصیت ضد باکتریایی این جدایه بر روی شاخص‌های مذکور در مقایسه با *اشریشیا کلی* (7/591 میلی‌متر) تفاوت معنی‌دار بود ($p<0/05$).

خاصیت ضد باکتریایی پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی* به روش ریز رقت: نتایج به دست آمده از تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون نشان داد که *پدیوکوکوس*

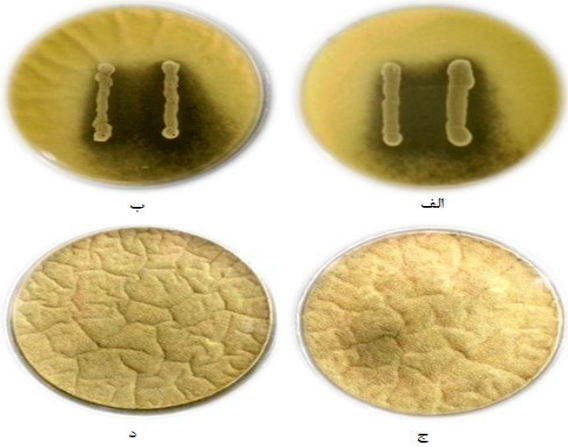
استیلسی، 10 ساعت پس از زمان گرمخانه‌گذاری به انتهای فاز رشد لگاریتمی رسید. لذا برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت *پدیوکوکوس استیلسی* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون به ترتیب 8 و 12 ساعت پس از کشت جدایه، پالیده تهیه شد. بیشترین خاصیت بازدارندگی پالیده‌های حاصل از کشت *پدیوکوکوس استیلسی* مربوط به پالیده خام فاز لگاریتمی و کمترین آن مربوط به پالیده خنثی شده فاز سکون بود (جدول 1). علاوه بر این عمدتاً بین خاصیت ضد باکتریایی پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از کشت جدایه مذکور در فازهای رشد لگاریتمی و سکون بر روی باکتری‌های شاخص تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$). همچنین بر اساس این نتایج، بین اثر بازدارندگی هر پالیده بر روی چهار شاخص باکتریایی تفاوت معنی‌دار بود ($p<0/05$). بیشترین اثر بازدارندگی پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* و کمترین اثر بازدارندگی آن‌ها بر روی *اشریشیا کلی* مشاهده شد.

جدول 1. درصد کاهش جمعیت (cfu/ml) شاخص‌های باکتریایی در حضور پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از کشت *پدیوکوکوس استیلسی* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون

	شاخص‌های باکتریایی			
	استافیلوکوکوس اورئوس	*لیستریا مونوسیتوژنز*	*اشریشیا کلی*	*باسیلوس سوبتیلیس*
پالیده خام فاز لگاریتمی	65/220±0/099 ^{Ac}	76/340±0/721 ^{Ab}	17/050±0/636 ^{Ad}	84/355±0/403 ^{Aa}
پالیده خنثی فاز لگاریتمی	58/140±0/622 ^{Cc}	71/705±3/147 ^{ABb}	14/660±0/537 ^{Bd}	74/830±0/672 ^{Ca}
پالیده خام فاز سکون	61/830±0/792 ^{Bc}	74/985±0/163 ^{Bb}	15/230±0/919 ^{Bd}	81/145±1/004 ^{Ba}
پالیده خنثی فاز سکون	54/750±1/754 ^{Dc}	65/565±0/035 ^{Cb}	11/185±0/247 ^{Cd}	71/365±1/294 ^{Da}

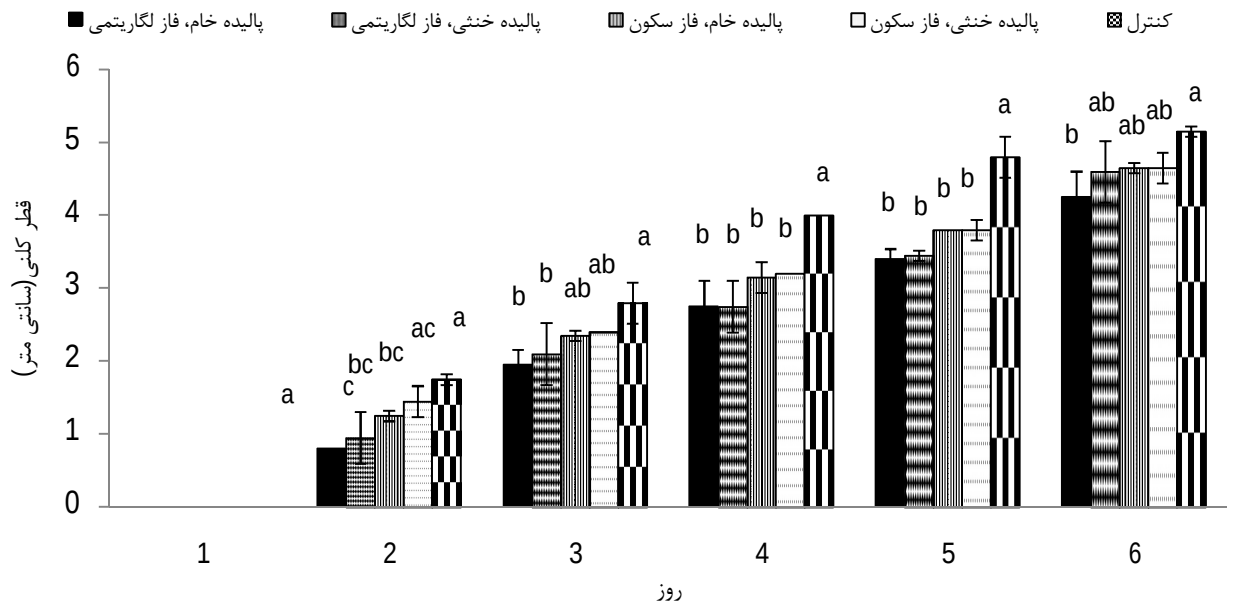
*نتایج به صورت میانگین سه تکرار±انحراف معیار بیان شده است. حروف بزرگ ناهمسان در هر ستون و حروف کوچک ناهمسان در هر ردیف، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح 0/05 می‌باشد.

خاصیت ضد قارچی *پدیوکوکوس استیلسی* به روش کشت دو لایه: بر این اساس، بین خاصیت ضد قارچی *پدیوکوکوس استیلسی* بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$) اما خاصیت ضد قارچی این جدایه لاکتیکی بر روی *آسپرژیلوس نایجر* تا حدی بیشتر از *آسپرژیلوس فلاووس* بود.



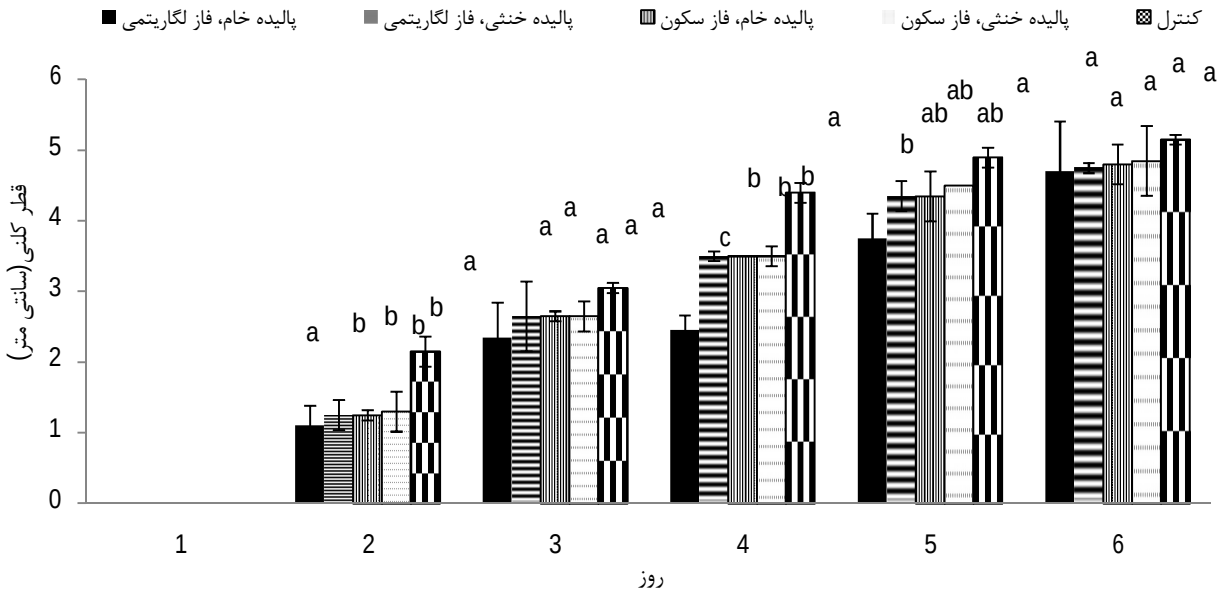
شکل 2. هاله عدم رشد *آسپرژیلوس فلاووس* (الف) و *آسپرژیلوس نایجر* (ب) در حضور *پدیوکوکوس استیلسی* در مقایسه با نمونه‌های کنترل *آسپرژیلوس فلاووس* (ج) و *آسپرژیلوس نایجر* (د) به روش کشت دولایه.

خاصیت ضد قارچی پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی* به روش لکه‌گذاری اسپور: تعیین میانگین روزانه قطر کلنی قارچ‌ها در حضور و عدم حضور پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون پدیوکوکوس *استیلسی* تا روز ششم که قارچ‌ها به طور کامل سطح پلیت کنترل را پوشاندند ادامه یافت (شکل‌های 3 و 4). بر اساس این نتایج، پالیده خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی در مقایسه با سایر پالیده‌ها دارای بیشترین خاصیت ضد قارچی بود. در روز اول هیچ رشدی مشاهده نشد ولی از روز دوم بین میزان رشد کلنی قارچ‌ها در محیط کنترل نسبت به محیط‌های حاوی پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از کشت جدایه مذکور در فازهای رشد لگاریتمی و سکون تفاوت معنی‌دار بود. در روز ششم *آسپرژیلوس فلاووس* از نظر میزان رشد کلنی در محیط کنترل تنها نسبت به محیط حاوی پالیده خام فاز لگاریتمی تفاوت معنی‌داری نشان داد ($p<0/05$). در صورتی که در مورد *آسپرژیلوس نایجر* تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).



شکل 3. قطر کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور و عدم حضور (کنترل) پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از کشت پدیوکوکوس *استیلسی* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون به روش لکه‌گذاری سوسپانسیون اسپور

*حروف ناهمسان در هر روز، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح 0/05 است.



شکل 4. قطر کلنی *آسپرژیلوس نایجر* در حضور و عدم حضور (کنترل) پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از کشت پدیوکوکوس *استیلسی* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون به روش لکه‌گذاری سوسپانسیون اسپور

*حروف ناهمسان در هر روز، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح 0/05 است.

• بحث

شناسایی جدایه لاکتیکی: با توجه به نتایج این پژوهش، پدیوکوکوس *استیلسی* به عنوان یکی از جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو شناسایی شد. در تحقیقاتی که با هدف شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک غالب خمیرترش صورت پذیرفت نیز حضور جنس پدیوکوکوس تأیید شده است. در این زمینه می‌توان به مطالعه‌ای که Lattanzi و همکاران در سال 2013 برای شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هیجده نمونه خمیرترش ایتالیایی انجام دادند اشاره کرد (21). Robert و همکاران در سال 2009 نیز در بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسید لاکتیک خمیرترش‌های فرانسوی دریافتند که 38% از باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده به جنس پدیوکوکوس تعلق داشتند (22). لذا اگر چه عمده‌ترین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش به جنس *لاکتوباسیلوس* تعلق دارند اما باکتری‌های جنس پدیوکوکوس نیز در خمیرترش یافت می‌شوند (24، 23).

خاصیت ضد باکتریایی *پدیوکوکوس استیلسی*: نتایج حاصل از روش انتشار دیسک نشان داد که پدیوکوکوس *استیلسی* از خاصیت ضد باکتریایی مناسبی برخوردار است. این نتایج با یافته‌های Simsek و همکاران در سال 2006 که دریافتند جدایه لاکتیکی پدیوکوکوس بر روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* دارای خاصیت بازدارندگی بود و همچنین با مطالعات Gurira و همکاران در سال 2005 که طی آن مشخص شد پدیوکوکوس *پنتوزاسئوس* و پدیوکوکوس *اسیدی‌لاکتیس* دارای خاصیت آنتاگونیستی در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند همخوانی دارد (25، 7). Hladíkova و همکاران نیز در سال 2012 طی بررسی خاصیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی کروی شکل دریافتند که پدیوکوکوس *پنتوزاسئوس* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای خاصیت آنتاگونیستی بود (26). ویژگی بازدارندگی پدیوکوکوس در برابر این میکروارگانیسم‌ها را می‌توان در درجه نخست به تولید اسیدهای آلی و علاوه بر این، تولید برخی از پپتیدهای ضد میکروبی شناخته شده نظیر باکتریوسین‌ها توسط این باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت داد (27).

خاصیت ضد باکتریایی پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی*: بر اساس نتایج روش ریز رقت، مشخص شد که پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون پدیوکوکوس *استیلسی* نیز دارای خاصیت ضد باکتریایی هستند. نتایج تحقیقات طباطبایی یزدی و همکاران در سال 1394 بر روی خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک حاکی از آن بود که پالیده فاقد سلول پدیوکوکوس *پنتوزاسئوس* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* دارای خاصیت ضد میکروبی بود. همچنین بر اساس نتایج پژوهش مذکور، بیشترین فعالیت ضد میکروبی پالیده در pH اسیدی مشاهده گردید و هر چه pH پالیده عاری از سلول جدایه لاکتیکی به سمت خنثی و قلیایی سوق داده شد میزان فعالیت ممانعت کنندگی آن کاهش یافت (28). Cizeikiene و همکاران در سال 2013، با بررسی خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک دریافتند که پالیده پدیوکوکوس *پنتوزاسئوس* و پدیوکوکوس *اسیدی‌لاکتیس* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* دارای خاصیت ممانعت‌کنندگی است (10). در مطالعه Nghe و Nguyen درسال 2014 نیز بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی پدیوکوکوس *پنتوزاسئوس* در انتهای فاز لگاریتمی آن مشاهده شد که معادل با اثر ضد میکروبی سفالوسپورین بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. تولید اسید لاکتیک و اسید استیک، مهم‌ترین عوامل ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک به شمار می‌آید (29). با توجه به هوموفرمنتاتیو بودن پدیوکوکوس *استیلسی* اثر ضد میکروبی جدایه مذکور به تولید اسیدهای آلی خصوصاً اسید لاکتیک بستگی دارد. علاوه بر این با توجه به اینکه خنثی‌سازی پالیده کشت پدیوکوکوس *استیلسی*، اثر بازدارندگی آن را کاهش داد می‌توان فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت این جدایه لاکتیکی را مربوط به مشتق‌های اسیدی تولید شده و یا باکتریوسین‌هایی دانست که در pH خنثی فعال نیستند.

خاصیت ضد قارچی پدیوکوکوس *استیلسی*: نتایج حاصل از روش کشت دو لایه نشان داد که جدایه پدیوکوکوس *استیلسی* دارای اثر بازدارندگی بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* است. مطالعه Magnusson و همکاران نیز در سال 2003 اثر ضد قارچی پدیوکوکوس *پنتوزاسئوس* و پدیوکوکوس *پارولوس* (*P. parvulus*) را بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس* تأیید کرد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. خاصیت ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک نه تنها به تولید اسیدهای آلی (اسید استیک و اسید

لاکتیک) مربوط می‌شود بلکه دی‌پپتیدهای حلقوی و ترکیبات فعال نظیر 4-هیدروکسی فنیل پروپانوئیک اسید، فنیل پروپانوئیک اسید و فنیل لاکتیک اسید نیز در خاصیت ضد قارچی آن‌ها نقش دارند (19).

خاصیت ضد قارچی پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی*: بر اساس نتایج به دست آمده از روش لکه‌گذاری اسپور، پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس استیلسی* دارای خاصیت بازدارندگی بر روی قارچ‌های مورد مطالعه بودند. Muhialdin و همکاران در سال 2011 با مطالعه خاصیت ضد قارچی پالیده کشت *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* تحت تاثیر pH بیان کردند که باکتری مورد نظر دارای خاصیت ضد قارچی بر علیه *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلویس اوریزا* (*A. oryzae*) بوده و بیشترین خاصیت ضد قارچی آن در pH=5 مشاهده گردید (30) که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک با توجه به نژاد و گونه آن‌ها بسیار متفاوت می‌باشد. علاوه بر این، عوامل زیادی بر میزان تاثیرگذاری ترکیبات ضد قارچی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک موثر است که از آن جمله می‌توان به pH، زمان گرمخانه‌گذاری و نوع متابولیت‌های تولیدی اشاره کرد (31). از ساز و کارهای ضد میکروبی متعددی که در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است می‌توان به اثر متقابل بین اسیدهای آلی با ترکیبات دارای وزن مولکولی پایین، دی استیل و پپتیدهای زیست فعال نیز اشاره کرد (33، 32).

در این پژوهش برای نخستین بار در کشور، باکتری *پدیوکوکوس استیلسی* به عنوان جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو جداسازی و به روش مولکولی شناسایی شد. همچنین ویژگی‌های ضد میکروبی این جدایه لاکتیکی و پالیده‌های خام و خنثی شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نیز حاکی از خاصیت ضد باکتریایی و ضد قارچی جدایه مذکور و پالیده‌های کشت آن بود. امروزه با توجه به نگرانی‌های مصرف‌کنندگان فرآورده‌های غذایی فرموله شده، نیاز به جایگزین‌های طبیعی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی محسوس‌تر می‌باشد. لذا استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آن‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان از *پدیوکوکوس استیلسی* به عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه در فرآوری مواد غذایی تخمیری و یا پالیده‌های حاصل از کشت این جدایه به واسطه برخورداری از قابلیت ضد میکروبی به عنوان نگهدارنده زیستی در فرآوری مواد غذایی بهره برد. البته مطالعات بیشتری برای شناسایی و تعیین ویژگی‌های ترکیبات ضد میکروبی جدایه لاکتیکی مذکور باید صورت گیرد.

• References

1. Preedy V, Watson R, Patel V, editors. Flour and breads and their fortification in health and disease prevention. Amsterdam Boston: Academic press 2011. p. 37-38.
2. Poutanen K, Flander L, Katina K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiol 2009; 26 (7): 693–699.
3. Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int J Food Microbiol 1999; 50 (1-2): 131–149.
4. Vanderbergh PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol Rev 1993; 12 (1-3): 221–237.
5. Servin AL. Antagonist activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev 2004; 28 (4): 405-440.
6. Suskovic J, Kos B, Beganovic J, Pavunc AL, Habjanic K, Matosic S. Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technol Biotechnol 2010; 48 (3): 296–307.
7. Simsek O, Hilmi Con A, Tulumoglu S. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control 2006; 17 (4): 263–270.
8. Mentes O, Ercan R, Akcelik M. Inhibitor activities of two *lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *bacillus* strains. Food Control 2007; 18 (4): 359-363.
9. Corsetti A, Settanni L, Braga TM, Silva Lopes MF, Suzzi G. An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. LWT-Food Sci Technol 2008; 41 (7): 1173–1182.
10. Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskericius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control 2013; 31 (3): 539-545.

11. AACC International. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. St. Paul, MN. 2010 AACC methods 46-30.

12. Zannini E, Garofalo C, Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G**,** Clementic F. Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiol 2009; 26 (7): 744-753.

13. Katina K, Sauri M, Alakomi HL, Mattila Sandholm T. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. LWT- Food Sci Technol 35 (1): 38–45.

14. Zhang J, Liu W, Sun Z, Bao Q, Wang F, Yu J, et al. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in inner Mongolia of China. Food Control 2011; 22 (5): 767-774.

15. Ferchichi M, Valcheva R, Pervost H, Onno B, Dousset X. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiol 2007; 24 (7-8): 678–686.

16. Gulahmadov SG, Abdullaeva NF, Guseinova NF, Kuliev AA, Ivanova IV, Dalgalarondo M, et al. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. Appl Biochem Microbiol 2009; 45 (3): 266–271.

17. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infec Dis 2009; 49 (11): 1749-1755.

18. Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl Environ Micro 2003; 69 (1): 634-640.

19. Magnusson J, Strom K, Roos S, Sjogren J, Schnurer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 2003; 219 (1): 129-135.

20. Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. Plos One 2012; 7 (1): 1–7.

21. Lattanzi A, Minervini F, Di Cagno R, Diviccaro A, Antonielli L,Cardinali G, et al. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. Int J Food Microbiol 2013; 163 (2-3): 71–79.

22. Robert H., Gabriel V., Fontagné-Faucher C. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. Int J Food Microbiol 2009; 135 (1): 53–59.

23. Gobbetti M. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. Trends Food Sci Tech 1998; 9 (7): 267–274.

24. Lonner C, Welander T, Malin N, Dostalek M. The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal. Food Microbiol 1986; 3 (1): 3–12.

25. Gurira OZ, Buys EM. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. Food Microbial 2005; 22 (2-3): 159-168.

26. Hladíkova Z, Smetankova J, Greif G, Greifova M. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. Acta Chimica Slovaca 2012; 5 (1): 80-85.

27. Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J Food Protect 1989; 4: 376-442.

28. Tabatabaei Yazdi F, Vasiee AR, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi SA. Diversity of lactic acid bacteria communities in “Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds. Iranian J Food Sci Technol 2015; 13 (1): 1-14 [in Persian].

29. Nghe D, Nguyen T. Characterization of antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* Vtcc-B-601. Appl Pharma Sci 2014; 4 (05): 061-064.

30. Muhialdin BJ, Hassan Z, Sadon S, Zulkifli NA, Azfar AA. Effect of pH and heat treatment on antifungal activity of *Lactobacillus fermentum* TE007, *Lactobacillus pentosus* G004 and *Pediococcus pentosaceus* TE010. Food Biotech 2011; 8 (3): 41-53.

31. Khorasanchi N, Peighambardoust SH, Hejazi MA, Raafat SA. Effect of freezing and freeze-drying process on the survival of sourdough lactic acid bacteria. Food Res 2011; 21 (2): 248-255 [in Persian].

32. Tofangsazan F, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Eshaghi Z. Investigation of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional kordish cheese in comparison with commercial strains. Iran J Med Microbiol 2013; 7 (3): 34-41 [in Persian].

33. Gupta R, Srivastava S. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from *Lactobacillus plantarum* strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. Food Microbiol 2014; 42 (1): 1–7.

Evaluating the Antimicrobial Properties of *Pediococcus Stilesii* Isolated From Whole Barley Sourdough

Khashaie M[1], Sadeghi A[2], Khomeiri M[3], Kashaninejad M[4], SadeghiMahunak A[3]

1. *MSc Student of Food Biotechnology, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran*
2. *Corresponding Author: Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. E-mail: sadeghi.gau@gmail.com*
3. *Associate Prof, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran*
4. *Full prof, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran*

Received 3 Jun, 2016 **Accepted 25 Sept, 2016**

Background and Objectives: Non-aseptic fermentation ecosystems such as sourdough are the best substrate for lactic acid bacteria (LAB) with antimicrobial properties. This study was carried out to evaluate the antimicrobial properties of a dominant isolated LAB from whole barley sourdough against some food borne pathogens.

Materials & Methods: In this experimental study after molecular identification of LAB isolate, the antimicrobial properties of the isolate and it's cell free culture filtrate (CCF) as native and neutralized CCF, obtained from logarithmic and stationary phases were investigated. For this purpose, disc diffusion and microdilution (antibacterial) and also overlay and agar spore spot (antifungal) methods were used. Results were compared by the one way analysis of variance.

Results: Sequencing results of PCR products lead to identification of *Pediococcus stilesii* as LAB isolate from barley sourdough. Results of investigating the antibacterial activities indicated that the highest antagonistic effect of the isolate and it's native CCF obtained from the logarithmic phase were observed against *Bacillus subtilis* in comparison to other indicator bacteria ($p<0.05$). Furthermore, *P. stilesii* and it's CCF had proper antifungal effects on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*.

Conclusion: Based on the results of this study, it is possible to use from the *P.stilesii* and it's CCF as bio preservative for controlling some microbial indicators in food and medical technologies.

Keywords: *Pediococcus stilesii, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Bacillus subtilis,* Antimicrobial activity