بررسی فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی سویه‌های *L.plantarum* بومی جدا شده از موادغذایی مختلف

دینا شهرام‌پور[1*]، مرتضی خمیری[2]، محبوبه کشیری[3]، محمد علی رضوی[4]

۱ – دانشجوی دکتری، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر ترکیبات ضدمیکروبی حاصل از چهار سویه‌ی مختلف *L.plantarum* جدا شده از چند منشاء غذایی (زیتون تخمیری، خمیر ترش، پنیرکوزه و شیر شتر) بر چهار باکتری بیماری‌زای شاخص (*Escherichia coli*، *listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus* و *Salmonella Enteritidis*) و دو کپک عامل فساد موادغذایی (*Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger*) بود. بدین منظور فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی هر یک از سویه‌ها به ترتیب در روش نفوذ در چاهک، کشت دولایه و لکه گذاری اسپور مورد آزمون قرار گرفت. جهت تعیین ماهیت ترکیبات ضدمیکروبی روماند فیلتر شده فاقد سلول هریک از سویه‌های *L.plantarum* نیز از تیمارهای مختلف حرارتی و آنزیمی و خنثی سازی با سود استفاده شد. نتایج نشان داد که همه سویه‌ها فعالیت ضدمیکروبی خوبی علیه میکروارگانیسم‌های شاخص مورد مطالعه نشان دادند و میزان فعالیت بسته به نوع سویه متفاوت بود. همچنین تفاوت معناداری بین فعالیت ضدمیکروبی سوسپانسیون کشت فعال و روماند فاقد سلول در روش چاهک دیده نشد و بیشترین هاله عدم رشد علیه باکتری *E.coli* (۱۳,٦۷±۰,۵۷) مشاهده گردید. همچنین سویه جدا شده از خمیر ترش فعالیت ضدکپکی بالایی بر ضد هر دو کپک نشان داد. به طور کلی کپک *A.flavus* در برابر متابولیت‌های تولیدی سویه‌های *L.plantarum* از حساسیت بیشتری نسبت به *A.niger* برخوردار بود. تیمار حرارتی روماند فاقد سلول هیچ گونه تاثیری در کاهش و یا افزایش خاصیت ضد میکروبی سویه‌ها نداشت در حالیکه خنثی سازی با سود خاصیت ضد میکروبی را به صفر رساند. همچنین به جز دو سویه فعالیت ضدمیکروبی روماند فیلتر شده فاقد سلول تحت تاثیر تیمار پروتئیناز K قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌های بومی *L.plantarum* و ترکیبات ضدمیکروبی تولیدی آنها پتانسیل خوبی جهت استفاده به عنوان نگهدارنده طبیعی در مواد غذایی را دارند.

کلید واژگان: *L.plantarum*، باکتری‌های شاخص بیماری‌زا، کپک‌های عامل فساد، فعالیت ضد میکروبی.

* مسئول مکاتبات: Dina.Shahrampour@gmail.com

۱- مقدمه

امروزه کیفیت و ایمنی محصولات غذایی یکی از دغدغه‌های مهم صنعت غذا در سراسر جهان به شمار می‌آید. علیرغم بهبود اصول بهداشتی هنوز هم آمار سالانه مسمومیت‌ها و عفونت‌های ناشی از مصرف غذاهای آلوده در کشورهای در حال توسعه بالا است. همچنین مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی منجر به گسترش ظهور سویه‌های مقاوم شده‌است. از سوی دیگر زوال مواد غذایی و محصولات کشاورزی در اثر فساد قارچی باعث زیان های اقتصادی در خور توجهی می‌شود. به طوریکه سالانه بیش از ٪۱۰- ۵ از محصولات غذایی در اثر فساد قارچی از بین می‌روند. علاوه بر این برخی از کپک‌ها مانند گونه‌های آسپرجیلوس قادرند که ترکیبات سمی به نام مایکوتوکسین‌ها را تولید نمایند که در برابر تیمارهای حرارتی مقاوم هستند و اثرات سرطان‌زایی و جهش زایی برای مصرف‌کنندگان دارند[۱]. شیوع آلودگی کپک‌ها و مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی به علت ماهیت قارچ ها و توانایی رشدشان بر روی بسترهای مختلف و کمبود اقدامات کنترلی موثر می‌باشد [۲].

در حال حاضر، صنعت غذا برای افزایش زمان ماندگاری و کنترل میکروارگانیسم‌های عامل فساد یا بیماری‌زا وابسته به مواد نگهدارنده شیمیایی است. در سال‌های اخیر با توجه به افزایش آگاهی مصرف کنندگان در مورد مخاطرات بهداشتی مرتبط با مواد شیمیایی، تقاضا برای مصرف غذاهای حاوی مواد نگهدارنده طبیعی گسترش یافته است. بنابراین انتخاب و به کارگیری سویه‌های میکروبی که قادر به تولید ترکیباتی با قابلیت ضدمیکروبی هستند مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌تواند مطلوب باشد [۳]. به کارگیری باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آنها در صنایع غذایی موجب کاهش و یا حذف نگهدارنده های شیمیایی و تیمارهای شدید حرارتی می‌گردد که نتیجه آن حفظ خواص تغذیه‌ای ماده‌غذایی است [٤و٥].

باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌هایی گرم مثبت، غیر اسپورزا، کاتالاز منفی و میکروآئروفیل می‌باشند که به شرایط اسیدی مقاوم بوده و به شدت تخمیر کننده هستند و اسید لاکتیک عمده‌ترین محصول تخمیر قند در آنها است. این باکتری‌ها علاوه بر اسیدهای آلی قادرند که ترکیبات ضدمیکروبی دیگری از جمله پراکسید هیدروژن، دی استیل، کربن دی اکسید، اسیدهای چرب، فنیل‌لاکتیک، دی پپتیدهای حلقوی و باکتریوسین نیز تولید نمایند [٦]. همچنین با توجه به سابقه طولانی مدت استفاده ایمن از باکتری‌های اسید لاکتیک در تخمیر مواد غذایی و خوراک ، آنها هر دو عنوان GRAS[1] و QPS[2] را از اتحادیه اروپا دریافت کرده اند [۷و ۸].

محصولات غذایی تخمیری از تنوع بسیاری برخوردار هستند و از دیر باز در کشورهای مختلف آسیایی از جمله ایران مورد استفاده قرار می‌گیرند و به عنوان منشاء غنی برای جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک به خصوص جنس لاکتوباسیلوس به شمار می‌روند. تاکنون گزارشات بسیاری در مورد خاصیت ضدمیکروبی ترکیبات تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک منتشر شده‌است. علاوه بر این محققین بیان داشته‌اند که فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند با منشاء جداسازی و نوع سویه در ارتباط باشد[۹].

Lactobacillus plantarum یکی از گونه‌های مهم و مقاوم باکتری‌های اسیدلاکتیک است که در مناطق مختلف زیست محیطی و حتی در دستگاه گوارش انسان و حیوانات به فراوانی یافت می‌شود. علاوه بر این در تخمیر بسیاری از موادغذایی گیاهی(زیتون، ساورکرات)، شیر، پنیر، گوشت، خمیر ترش، قهوه و غلات به عنوان گونه میکروبی غالب نقش موثری دارد [۱۰]. همچنین در مطالعات متعددی به فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های*L.plantarum* اشاره شده است به عنوان مثال، گرز و همکاران(۲۰۰۹) در مطالعه‌ای فعالیت ضدکپکی مطلوب چهار سویه لاکتیکی *Lactobacillus plantarum CRL 778*، *Lactobacillus reuteri CRL 1100* ، *Lactobacillus brevis CRL 772* و *Lactobacillus brevis CRL 796* علیه کپک‌های عامل فساد نان شامل *Aspergillus*، *Fusarium* و *Penicillium*را به منظور به کارگیری به عنوان کشت آغازگر در تولید نان گزارش کردند[۱۱]. وانگ و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی فعالیت ضدکپکی سویه *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 جدا شده از کومیس علیه شش کپک عامل فساد غذایی پرداختند آنها همچنین متابولیت‌های ضدکپکی را مورد شناسایی قرار دادند و برای اولین بار باکتری اسیدلاکتیک تولید کننده بنزوئیک اسید و ۲-پروپنیل استر با خاصیت ضدکپکی را گزارش نمودند[۱۲]. در پژوهشی دیگر سانگمان و همکاران(۲۰۱٤) فعالیت ضدکپکی سویه

1. Generally Recognised as Safe
2. Qualified Presumption of Safety

Lactobacillus plantarum K35 جدا شده از نوعی برنج تخمیری در برابر رشد و تولید آفلاتوکسین توسط *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* را ارزیابی نمودند[۱۳]. هاشمی و همکاران(۲۰۱۶) فعالیت ضدمیکروبی چهار سویه *Lactobacillus plantarum* جدا شده از پنیر کردی علیه چهار باکتری شاخص بیماری‌زا را با سویه‌های تجاری مقایسه کردند، نتایج مطالعه آنها نشان داد که سویه‌های بومی در بسیاری از موارد از قابلیت ضد باکتریایی بالاتری نسبت به سویه‌های تجاری برخوردار بودند[۱٤]. در پژوهشی دیگر طباطبائی یزدی و همکاران(۲۰۱۵) به بررسی فعالیت ضدباکتریایی روماند حاصل از جدایه‌های لاکتیکی آش کارده به عنوان یک غذای تخمیری سنتی ایران، بر ضد باکتری-های گرم مثبت و گرم منفی شاخص بیماری‌زا پرداختند. آنها همچنین ماهیت ترکیبات شبه باکتریوسینی روماند حاصل از هر جدایه را مطالعه نمودند[۱۵]. صادقی و همکاران(۲۰۱٦) نیز قابلیت دو جدایه لاکتیکی حاصل از خمیر ترش آرد کامل گندم شامل *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus sakei* در مهار رشد *Aspergillus flavus* و کاهش آفلاتوکسین B1 را مورد ارزیابی قرار دادند [۱٦]. ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۷) نیز فعالیت ضدکپکی روماند خام وخنثی شده حاصل از فاز رشد لگاریتمی و سکون چند جدایه لاکتیکی علیه *Aspergillus flavus* و *Aspergillus niger* را ارزیابی نمودند[۱۷]. نتایج مطالعه ترمونته و همکاران (۲۰۱۷) نیز نشان داد که فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های مختلف *Lactobacillus plantarum* در سطح سویه متفاوت بود [۱۸]. با این حال اطلاعات محدودی در مورد نقش محیط جداسازی و نوع سویه بر فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی موجود می‌باشد که پژوهش بیشتر در این زمینه را می‌طلبد.

هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی چهار سویه بومی *L.plantarum* جدا شده از موادغذایی مختلف علیه چهار باکتری شاخص بیماری‌زا و دو کپک عامل فساد موادغذایی و همچنین ارزیابی ماهیت ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط این سویه‌ها می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش چهار سویه *L.plantarum* جدا شده از منابع غذایی مختلف شامل خمیرترش (KES10)، شیر شتر(KEM5)، زیتون تخمیری (KAO80) و پنیرکوزه (KMC45) که قبلا شناسایی مولکولی آنها انجام گرفته بود، از بانک میکروبی گروه صنایع غذایی- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه گردید. باکتری‌های شاخص بیماری-زایی نیز شامل *Escherichia coli* (PTCC 1399)، *listeria monocytogenes* (PTCC1298) و *Staphylococcus aureus* (PTCC1431) ، (PTCC 1709) *Salmonella Enteritidis* و همچنین کپک‌های عامل فساد شامل(PTCC 5004) *Aspergillus flavus* و (PTCC 5012) *Aspergillus niger* از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند. محیط کشت‌های MRS broth از شرکت لیوفیلکم ایتالیا، Muller Hinton Broth and Agar و Yeast extract glucose chloramphenicol agar از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

۲-۱- رشد و فعالسازی سویه‌های باکتریایی:

در این پژوهش ابتدا کشت ذخیره هر یک از سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* پس از خروج از فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد به منظور فعالسازی در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS broth تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸-۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. فعالسازی باکتری-های شاخص بیماری‌زا نیز (*Escherichia coli*، *listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus* و *Salmonella Enteritidis*) در محیط کشت MHB به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

۲-۲- تهیه روماند حاصل از سویه های *L.plantarum*

برای این منظور ابتدا هریک از سویه‌های *L.plantarum* در ۱۰ میلی لیتر محیط MRS broth تلقیح و به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس کشت فعال آنها تحت سانتریفوژ (۵۰۰۰*g به مدت ۱۵ دقیقه) قرار گرفت و روماند حاصل برای اطمینان از حذف کامل سلول‌های باکتریایی از فیلتر سرنگی با قطر ۰,۲ میکرومتر عبور داده شد. روماند بدست آمده برای هریک از سویه‌ها تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال نگهداری شد[۹].

۲-۳- ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی به روش نفوذ در چاهک[3]

در این روش ابتدا کشت فعال هریک از باکتری‌های شاخص بیماری‌زا با رقتی معادل نیم مک فارلند (10^8 cfu/ml) در سطح پلیت حاوی محیط کشت MHA تلقیح و به کمک سوآپ استریل به خوبی پخش گردید. سپس چاهک هایی با قطر ٦ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت فعال (WBC[4]) و یا روماند فاقد سلول (CFS[5]) هریک از سویه‌های *L.plantarum* در داخل چاهک‌ها تزریق شد. جهت جذب و انتشار بهتر ترکیبات ضدمیکروبی از چاهک‌ها، پلیت‌ها به مدت یک ساعت در یخچال (٤ درجه سانتی گراد) قرار گرفتند. سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند. در نهایت قطر هاله عدم رشدایجاد شده در اطراف چاهک‌ها به کمک خط‌کش اندازه‌گیری و برحسب میلی متر گزارش گردید [۹].

۲-٤- بررسی ماهیت ترکیبات ضدمیکروبی روماند فاقد سلول

جهت تعیین ماهیت شیمیایی ترکیبات بازدارنده تولیدی هریک از سویه‌های *L.plantarum* تیمارهای مختلفی به کار گرفته شد. برای این منظور روماند فاقد سلول به پنج قسمت تقسیم شد و دو بخش از آن جهت تعیین مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی به گرما تحت تیمارهای حرارتی ۸۰ و ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۳۰ و ۱۵ دقیقه قرار گرفت و پس از آن سریعا سرد شد. pH بخشی دیگر از روماندبه منظور حذف اثر بازدارندگی اسیدهای تولیدی توسط محلول NaOH ٤ M در محدوده خنثی تنظیم شد. همچنین دو بخش دیگر از روماند فاقد سلول به ترتیب تحت تیمار آنزیمی پروتئیناز K در غلظت نهایی ۱ mg/ml به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس خاصیت بازدارندگی هر یک از روماندهای فاقد سلول تیمار شده مذکور در برابر باکتری‌های شاخص بیماری‌زا در روش نفوذ در چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت و با نتایج بدست آمده در آزمون قبل مقایسه شد [۱۹].

۲-۵- ارزیابی فعالیت ضد کپکی به روش کشت دولایه

به منظور تعیین فعالیت ضدکپکی سویه‌های *L.plantarum* از روش سانگمان و هونگ پاتارک(۲۰۱٤) با اندکی تغییر استفاده شد. در این روش دو لایه آگار متفاوت به کار گرفته می‌شود که لایه اول یا زیرین برای رشد باکتری و لایه دوم یا بالایی برای رشد کپک مناسب می‌باشد. ابتدا از کشت فعال هریک از سویه-های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به میزان ۱۰ میکرولیتر در سطح محیط کشت MRS agar لکه گذاری شد. پلیت‌ها به منظور رشد کافی لکه باکتری به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. برای تهیه سوسپانسیون اسپور هریک از کپک‌های *Aspergillus flavus* یا *Aspergillus niger* نیز ابتدا اسپورها به کمک آب مقطر استریل از سطح پلیت‌های حاوی کشت ۷ روزه کپک جمع آوری شده، سپس توسط لام هموسایتومتر شمارش شدند. در مرحله بعد هر پلیت حاوی کشت باکتری با ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت YGC agar حاوی اسپور کپک (10^5 spores/ml) پوشانده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرارگرفت. سپس براساس مساحت هاله عدم رشدتشکیل شده درصد بازداری از رشد کپک نسبت به پلیت کنترل تعیین شد [۱۳].

۲-٦- ارزیابی فعالیت ضد کپکی به روش لکه گذاری اسپور

جهت ارزیابی خاصیت ضدکپکی روماند فاقد سلول حاصل از هریک از سویه‌های *L.plantarum* از روش لکه گذاری اسپور ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۷) استفاده شد. بدین منظور در هر پلیت ٦ سانتی‌متری ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط محیط کشت YGC agar و روماند فاقد سلول با نسبت‌های مختلف (٪۵۰-۱۰) ریخته شد. از پلیت حاوی محیط کشت YGC agar فاقد روماند نیز به عنوان کنترل استفاده گردید. سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هریک از کپک‌های *Aspergillus flavus* یا *Aspergillus niger* با رقت 10^5 spores/ml، در مرکز پلیت لکه‌گذاری شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و قطر رشد کلنی کپک در آنها تا زمانی‌که کپک در نمونه کنترل به طور کامل سطح پلیت را پوشاند، اندازه‌گیری شد[۱۷].

3.Well diffusion method
4.Whole Bacteria Culture
5. Cell-Free Supernatant

۲-۷- آنالیز آماری داده‌ها

در این پژوهش تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. آنالیز و تجزیه تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS۲۳ به روش کاملا تصادفی صورت گرفت و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن با درصد خطای ۵ درصد استفاده شد (نرم افزارSPSS۲۳، امریکا). تمامی نمودارها به کمک نرم افزار EXCEL ۲۰۱۰ رسم شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی فعالیت ضدباکتریایی سویه‌های *L.plantarum*

در این مطالعه فعالیت ضدمیکروبی چهار سویه بومی *L.plantarum* جدا شده از منابع غذایی مختلف (زیتون تخمیری، شیر شتر، پنیر کوزه و خمیر ترش) علیه چهار باکتری شاخص بیماری‌زایی بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون نفوذ در چاهک نشان داد که تمامی سویه‌ها بر هر چهار باکتری شاخص گرم مثبت و گرم منفی موثر بودند، اما دامنه فعالیت ضد میکروبی آنها با توجه به نوع سویه و منشا جداسازی تا حدی متفاوت بود. نتایج مطالعه هاشمی و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان داد که جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حاصل از پنیر کردی از فعالیت ضدباکتریایی خوبی بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا شامل *B.cereus*، *S.aureus*، *E.coli* و *P. aeruginosa* در آزمون نفوذ در چاهک و دیسک برخوردار بودند و برای برخی از سویه‌های *L.plantarum* این اثر بازدارندگی نسبت به سویه‌های تجاری بیشتر بود [۱۴]. این در حالی است که در مطالعه زاگو و همکارنش(۲۰۱۱) هیچ یک از ۹۸ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از پنیرهای ایتالیایی و آرژانتینی قابلیت بازدارندگی بر باکتری‌های بیماری‌زا نداشتند[۲۰]. برطبق شکل ۱ قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط روماند فیلتر شده فاقد سلول سویه‌های *L.plantarum* مورد مطالعه بین ۱۳،۳۳- ۱۰ میلی‌متر متغیر بود. تمامی جدایه-های مورد بررسی کمترین فعالیت ضد باکتریایی را علیه باکتری *S.entritidis* نشان دادند و از این نظر اختلاف معناداری در میان آنها وجود نداشت ($p<0.05$). همچنین بزرگترین هاله عدم رشد بر ضد سایر باکتری‌های بیماری‌زا شامل *E.coli* ، *L.monocytogenes* و *S.aureus* توسط جدایه KMC45 جداشده از پنیر کوزه ایجاد شد. الداک و همکارانش (۲۰۱۷) گزارش نمودند که سویه‌های *L.plantarum* جدا شده از یک نوع پنیر فعالیت ضدمیکروبی بیشتری بر باکتری شاخص *E.coli* نسبت به *L. monocytogenes* داشتند[۹] که این نتیجه با مطالعات دیگر مبنی بر حساس بودن بیشتر باکتری‌های گرم مثبت در برابر ترکیبات ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک مغایرت دارد[۱۵] و احتمالا به حضور این باکتری شاخص بیماری‌زایی در محیط یا منشا جداسازی سویه‌های *L.plantarum* ارتباط دارد. لازم به ذکر است که هیچگونه تفاوت معناداری بین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سوسپانسیون کشت فعال و روماند فیلتر شده فاقد سلول جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه دیده نشد.

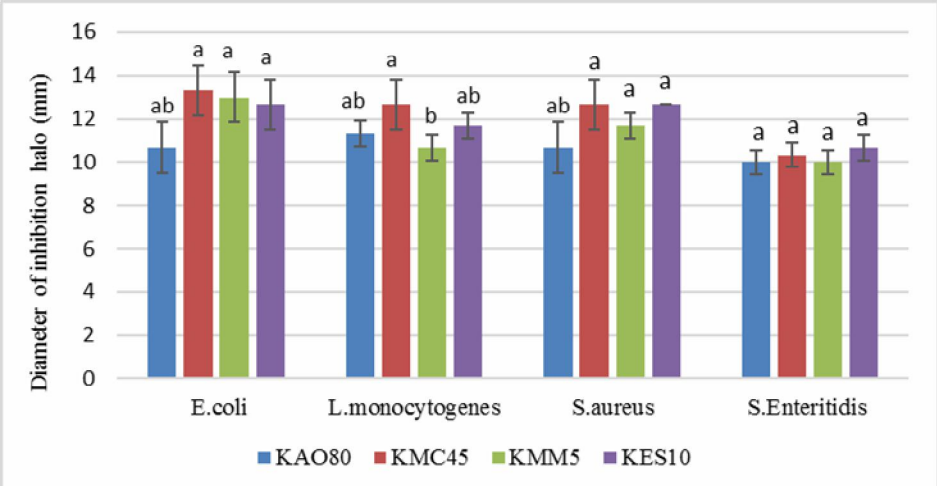

Fig 1 Antibacterial activity of *lactobacillus plantarum* strains in well diffusion method.

۳-۲- بررسی ماهیت ترکیبات ضدمیکروبی روماند فیلتر شده

نتایج مربوط به اثر تیمارهای مختلف بر خاصیت بازدارندگی روماند فاقد سلول سویه‌های *L.plantarum* در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمار حرارتی هیچ‌گونه تاثیری بر افزایش یا کاهش فعالیت بازدارندگی نداشت که نشان دهنده مقاومت حرارتی بالای ترکیبات ضدمیکروبی سویه‌های مورد مطالعه می‌باشد. طباطبایی یزدی و همکاران(۲۰۱۵) نیز گزارش نمودند که روماند حاصل از گونه *L.plantarum* در میان سایر گونه-های لاکتوباسیلوس جدا شده از آش کارده در برابر تیمار حرارتی بیشترین مقاومت را نشان داد [۱۵]. خنثی سازی روماند نیز منجر به از بین رفتن قابلیت مهاری کلیه سویه‌های *L.plantarum* شد که بیانگر این موضوع است که عمده فعالیت ضدمیکروبی این سویه‌ها وابسته به تولید اسیدهای آلی مانند اسیدلاکتیک و کاهش pH است. همچنین فعالیت برخی ترکیبات ضدمیکروبی مانند باکتریوسین‌ها وابسته به PH است که در محدوده pH خنثی و قلیایی فعالیت محدودی دارند. همچنین نتایج حاصل از بررسی اثر آنزیم پروتئیناز K بر روی خاصیت ضد میکروبی روماند نشان داد که اثر بازدارندگی در تمامی سویه‌ها به جز سویه‌های ٤٥و ۱۰ از بین رفت. این نتایج حضور ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین‌ها در روماند را تایید نمود، چرا که مورد تجزیه یک آنزیم پروتئولیک قرار گرفته‌اند و با حذف آنها قابلیت ضدباکتریایی به شدت کاهش یافته است. همچنین این نتایج می‌تواند مبین این موضوع باشد که احتمالا ترکیبات شبه باکتریوسینی در دو جدایه ۱۰ و ٤٥ ماهیت غیر پروتئینی داشته باشند. نتایج پژوهش هاشمی و همکاران(۲۰۱۵) نیز نشان داد که روماند حاصل از سویه‌های بومی و تجاری در برابر تیمار حرارتی مقاوم و نسبت به خنثی سازی حساس بودند[١٤]. همچنین عدالتیان دوم و همکاران(۲۰۱۵) گزارش نمودند که نتایج تیمار حرارتی، آنزیمی و خنثی سازی اعمال شده بر روی روماند حاصل از ۵۱ جدایه لاکتیکی به دست آمده از مراحل مختلف تولید مسکه، نسبت به تیمار کنترل در مورد هر جدایه متفاوت بود[۲۱].

Table 1 Diameter of inhibition halo (mm) after different treatment in well diffusion method.

Lactobacillus plantarum code	Heat treatment (121° C)	Heat treatment (80° C)	Neutralization treatment	Proteinase K	Control (no treatment)
KAO80	10.67 ± 1.15*	10.67 ± 1.15	0	0	10.67 ± 1.15
KMC45	13.33 ± 1.15	13.33 ± 1.15	0	7 ± 0.57	13.33 ± 1.15
KEM5	13 ± 1.73	13 ± 1.73	0	0	13 ± 1.73
KES10	12.67 ± 1.15	12.67 ± 1.15	0	8.5 ± 0.57	12.67 ± 1.15

* Data were mean values of five replicate determinations ± standard deviation. Means within columns not sharing the same superscript are significantly different ($p < 0.05$).

۳-۳- بررسی فعالیت ضد کپکی سویه‌های *L.plantarum*

بر طبق شکل ۲ طیف وسیعی از فعالیت بازدارندگی علیه هر دو کپک *A. niger* و *A. flavus* توسط سویه‌های *L.plantarum* مشاهده شد. این نتایج با گزارشات پیشین محققین در مورد قابلیت باکتری *L.plantarum* در بازداری از رشد و تولید اسپور در بسیاری از کپک های عامل فساد غذایی مانند *آسپرجیلوس، پنی سیلیوم، فوزاریوم و کلادوسپوریم* مطابقت دارد[۱، ۲و ۲۲]. در این مطالعه کمترین رشد کپک *A. niger* در حضور سویه جدا شده از خمیر ترش (KES10) و کمترین رشد کپک *A. flavus* در حضور سویه‌های جدا شده از پنیرکوزه (KMC45) و زیتون تخمیری (KAO80) مشاهده شد. به علاوه بررسی‌ها نشان داد که کپک *A. Flavus* در برابر متابولیت‌های تولیدی سویه‌های *L.plantarum* حساس تراز کپک *A. niger* بود. با توجه به مطالعات پیشین سانگمانی و هانگ پاتارگه (۲۰۱٤) احتمالا فعالیت ضدکپکی سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در این پژوهش به قابلیت تولید ترکیباتی شامل: اسیدهای آلی، ترکیبات پروتئینی، اسید-های چرب هیدروکسیل(با وزن مولکولی ٢٤٤- ١٨٨)، فنیل لاکتیک اسید، ٤- هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید، بنزوئیک اسید و تعداد بسیاری از دی پپتیدهای حلقوی مربوط می‌شود [۱۳].

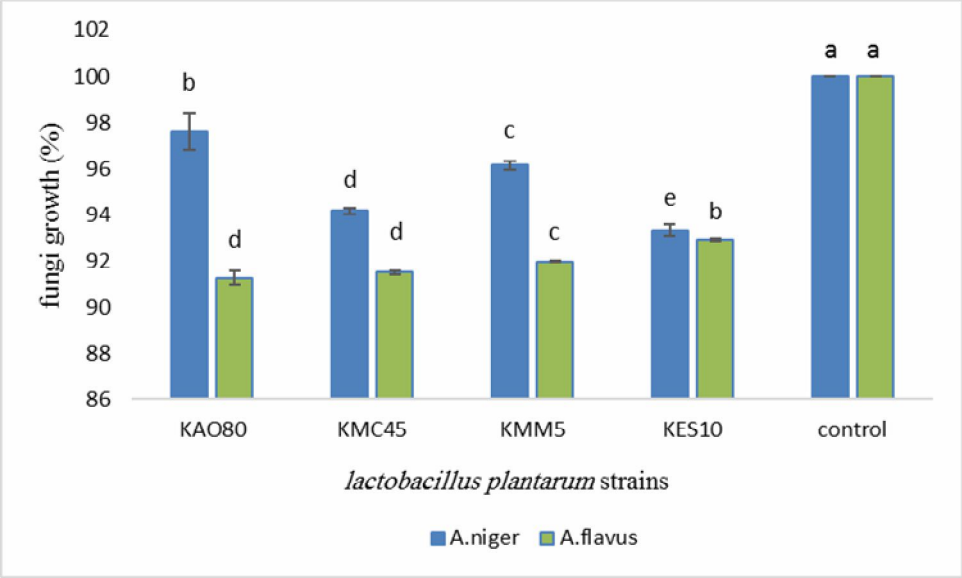

Fig 2 Percentage of fungi growth in presence of *Lactobacillus plantarum* strains.

در آزمون لکه گذاری اسپور نیز توانایی رشد کپک در حضور درصدهای مختلف روماند فاقد سلول حاصل از سویه‌های مختلف *L.plantarum* در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. بر طبق جدول ۲، از رشد کپک *A.niger* در حضور > ٤٠ ٪ روماند حاصل از تمامی جدایه‌های مورد مطالعه جلوگیری شد. در مورد کپک *A.flavus* نیز،۳۰ ٪ از روماند حاصل از جدایه KAO80 جدا شده از زیتون تخمیری و ۲۰٪ از روماند سایر جدایه‌ها اثر بازدارندگی از رشد داشتند. این نتایج مبین فعالیت ضدکپکی بیشتر متابولیت‌های موجود در روماند حاصل از سویه‌های *L.plantarum* بر ضد کپک *A.flavus* می‌باشد. در حالیکه نتایج مطالعه ابراهیمی و همکاران(۲۰۱۷) نشان داد که فعالیت ضدکپکی روماند حاصل از فاز سکون یک جدایه لاکتیکی (*Pediococus lolii*) در برابر کپک *A.niger* نسبت به *A.flavus* بیشتر بود. آنها همچنین بیان داشتند که عمده متابولیت‌های ضد کپکی در فاز سکون رشد جدایه‌های لاکتیکی تولید می‌گردد[۱۷]. گوبتا و همکاران (۲۰۱٤) نیز به بررسی اثر ضد کپکی پپتیدهای ضدمیکروبی حاصل از سویه *Lactobacillus plantarum strain LR/14* در مراحل مختلف رشد چهار کپک عامل فساد از جمله *A.niger* در محیط مایع پرداختند که نتایج این مطالعه بر فعالیت بازدارندگی قوی این متابولیت‌ها تاکید داشت[۲۲]. صادقی و همکاران (۲۰۱٦) نیز در ارزیابی فعالیت ضدکپکی دو جدایه لاکتیکی حاصل از خمیر ترش آرد کامل گندم، قابلیت ضدکپکی بالاتر *Lactobacillus plantarum* نسبت به *Lactobacillus sakei* در مهار رشد *A. flavus* و کاهش آفلاتوکسین B1 اشاره نمودند [۱٦]. به طور کلی فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک با توجه به گونه و نژاد آنها بسیار متفاوت است. علاوه بر این عوامل زیادی مثل شرایط کشت (دما و زمان، pH) بر میزان فعالیت ضد قارچی متابولیت‌های تولیدی این گروه از باکتری‌ها موثر می‌باشد.

Table 2 fungi growth in presence of cell free supernatant(CFS) of Lactobacillus plantarum strains.

	A.niger					*A.flavus*				
	% CFS in YGC agar									
Lactobacillus plantarum code	10	20	30	40	50	10	20	30	40	50
KAO80	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
KMC45	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
KEM5	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
KES10	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

+ growth , - no growth

٤- نتیجه گیری

در این پژوهش فعالیت ضدباکتریایی و ضدکپکی روماند حاصل از *Lactobacillus plantarum* بومی جدا شده از

موادغذایی مختلف به ترتیب توسط آزمون‌های نفوذ در چاهک، کشت دولایه و لکه گذاری اسپور مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که همه سویه‌های مورد بررسی از قابلیت بازدارندگی خوبی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای شاخص غذازاد و کپک‌های عامل فساد برخوردار بودند و فعالیت ضدمیکروبی آنها بسته به نوع سویه متفاوت بود. همچنین متابولیت‌های ضدمیکروبی حاصل از این سویه‌ها مقاومت حرارتی خوبی داشتند به طوریکه قادر بودند که دماهای بالا مشابه شرایط پاستوریزاسیون و استرلیزاسیون را تحمل کنند. به علاوه متابولیت‌های برخی از سویه‌ها (سویه جداشده از خمیر ترش و پنیر کوزه) در حضور آنزیم‌های پروتئولتیک فعالیت ضد باکتریایی خود را حفظ کردند. کلیه این نتایج قابلیت تکنولوژیکی مناسب ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط سویه‌های *Lactobacillus plantarum* را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه امروزه کاهش و یا حذف نگهدارنده‌های شیمیایی در موادغذایی یکی از دغدغه‌های مصرف کنندگان محسوب می‌شود بنابراین براساس نتایج این پژوهش می‌توان از جدایه‌های بومی *Lactobacillus plantarum* و متابولیت-های حاصل از آنها به عنوان "نگهدارنده‌های زیستی" در موادغذایی مختلف استفاده نمود. علاوه بر این مطالعات بیشتر به منظور شناخت و تعیین ویژگی‌های ترکیبات ضد میکروبی این جدایه‌های لاکتیکی پیشنهاد می‌گردد.

۵- منابع

[1] Yang, E. J., & Chang, H. C. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. International journal of food microbiology, 139(1), 56-63.

[2] Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J., & Meca, G. 2017. In vitro antifungal activity of bioactive peptides produced by Lactobacillus plantarum against Aspergillus parasiticus and Penicillium expansum. LWT-Food Science and Technology, 81, 128-135.

[3] Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., & Matošić, S. 2010. Antimicrobial activity–the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology, 48(3), 296-307.

[4] Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Soccol, C. R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Brazilian Archives of Biology and Technology, 50(3), 512-542.

[5] Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G., & Gobbetti, M. 2011. Antifungal activity of Wickerhamomyces anomalus and Lactobacillus plantarum during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. Applied and environmental microbiology, 77(10), 3484-3492.

[6] Herreros, M. A., Sandoval, H., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food microbiology, 22(5), 455-459.

[7] EFSA - European Food Safety Authority. 2007. Definition and description of 'emerging risks' within EFSA's mandate. EFSA/SC/415 Final. Available at http:// www.efsa.europa.eu/.

[8] EFSA - European Food Safety Authority. 2012. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update). EFSA Journal, 10 (12), 1-84, 3020. Available at :http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/ scientific_output/files/ main_documents/3020.pdft.

[9] Ołdak, A., Zielińska, D., Rzepkowska, A., & Kołożyn-Krajewska, D. 2017. Comparison of Antibacterial Activity of Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. BioMed Research International.

[10] Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A. 2017. Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: A review. Bulg. J. Vet. Med.

[11] Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G. and De Valdez, G.F. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria

with antifungal properties. Food control, 20(2), pp.144-148.
[12] Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H. and Qi, W. 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by Lactobacillus plantarum IMAU10014. PloS one, 7(1), p.e29452.
[13] Sangmanee, P. and Hongpattarakere, T. 2014. Inhibitory of multiple antifungal components produced by Lactobacillus plantarum K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. Food Control, 40, pp.224-233.
[14] Hashemi, S.M.B., Shahidi, F., Mortazavi, S.A., Milani, E. and Eshaghi, Z., 2015. Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional Kurdish cheese in comparison to reference strains against some pathogens. Food Science and Technology, 13(55), pp.103-113.
[15] Tabataba i Yazdi, F., Ali Zadeh Behbahani, B., Mortazavi, S.A. and Tabataba i Yazdi, F., 2015. Diversity of Lactic Acid Bacteria communities in “Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds. Food Science and Technology, 13(53), pp.1-14.
[16] Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Raeisi, M. 2016. Evaluating the potential of Lactobacillus isolated from whole wheat sourdough in reduction of Aflatoxin B1. Journal of Food Microbiology, 2(4), pp. 1-14.
[17] Ebrahimi, M., Khomeiri, M., Masoudi-Nejad, A., Sadeghi, A., Sadeghi, B. and Kashaninejad, M. 2017. Inhibitory effects of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods against aflatoxigenic Aspergillus spp. Comparative Clinical Pathology, 26(5), pp.1083-1092.
[18] Tremonte, P., Pannella, G., Succi, M., Tipaldi, L., Sturchio, M., Coppola, R., Luongo, D. and Sorrentino, E. 2017. Antimicrobial activity of Lactobacillus plantarum strains isolated from different environments: a preliminary study. International Food Research Journal, 24(2).
[19] Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. 2016. Use of Lactobacillus plantarum strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. Frontiers in microbiology, 7.
[20] Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suàrez, V., Vinderola, G., ... & Giraffa, G. 2011. Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses. Food Microbiology, 28(5), 1033-1040.
[21] Edalatian Dovom, M. R., Yavarmanesh, M., Ghiamati Yazdi, F., Khomeiri, M., & Nayyeri, N. 2015. Evaluation of antimicrobial activities of lactic flora isolated from production stages of Maskeh against food indicator bacteria. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 12(4), 438-452.
[22] Gupta, R. and Srivastava, S. 2014. Antifungal effect of antimicrobial peptides (AMPs LR14) derived from Lactobacillus plantarum strain LR/14 and their applications in prevention of grain spoilage. Food Microbiology, 42, pp.1-7.

Evaluation of antibacterial and antifungal activity of indigenous *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various foods

Shahrampour, D. [1*], Khomeiri, M. [2], Kashiri, M. [2], Razavi, S. A. [3]

1. PhD Student of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Dept of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources
3. Dept of Food Science and Technology, Ferdowsi University Of Mashhad

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial activity of four different strains of *lactobacillus-plantarum* isolated from several sources of food (fermented olives, sour dough, cottage cheese and camel milk) against four bacterial pathogens including *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella Enteritidis* and two food spoilage fungi (*Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*). Antibacterial and antifungal activity of each strain and its cell free supernatant (CFS) was tested in well diffusion, overlay and agar spore spot, respectively . To determine the nature of the antimicrobial compounds, CFS of *Lactobacillus plantarum* strains were also used for different thermal and enzymatic treatments and neutralization. The results showed that all strains had good antimicrobial activity against all bacteria and fungi and the activity level was different depending on the strain. Also, there was no significant difference between antimicrobial activity of active culture suspension and cell-free supernatant in well diffusion method, and the highest inhibition zone was observed against *E.coli* (13.67 ± 0.57). The high antifungal activity was observed in strains isolated from sour dough. Also, *A.flavus* was more sensitive to antimicrobial compounds of CFSs than *A.niger*. Thermal treatment of CFS did not have any effect on the reduction or increase of antimicrobial properties, while neutralization omit antimicrobial activity. Also, except two strains antimicrobial activity of all supernatants was affected by Proteinase K treatment. The results of this study showed that indigenous strains of *Lactobacillus plantarum* and their antimicrobial compounds have a good potential for use as a natural preservative in food**.**

Keywords: *Lactobacillus plantarum*, Pathogenic bacteria, Food spoilage fungi, Antimicrobial activity.

[*] Corresponding Author E-Mail Address: Dina.Shahrampour@gmail.com