Archive of SID

شناسایی مولکولی جدایه‌های لاکتیکی بدست آمده از چال در استان گلستان و بررسی فعالیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس* و *انتروکوکوس فاسیوم* ایزوله شده علیه پنی *سیلیوم کرایسوژنوم*

احمد نصرالله زاده[1]، **مرتضی خمیری**[1*]، علیرضا صادقی[1]

۱- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی - زیست فناوری مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

چکیده

هدف از انجام این پژوهش شناسایی مولکولی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از چال (شیر تخمیری شتر) و بررسی فعالیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده به عنوان نگهدارنده‌ای زیستی علیه کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* بود. در این پژوهش پس از انجام PCR با جفت پرایمرهای عمومی باکتری‌های اسید لاکتیک، نتایج توالی‌یابی با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه شد. از بین جدایه‌های شناسایی شده، اثر ضدقارچی جدایه‌های C۶، C۸ و C۱۷ به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی با استفاده از روش دولایه مورد بررسی قرار گرفت. براساس شناسایی آنالیز ناحیه ژنی 16 S rDNA باکتری‌های جدا شده ۲ نژاد از *لاکتوباسیلوس برویس* (کدهای C۶ و C۱۷) ، یک نژاد *انتروکوکوس هیرایی* (کد C۷) و یک نژاد *انتروکوکوس فاسیوم* (کد C۸) بودند. نتایج نشان داد که هر دو جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* و جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* دارای اثر بازدارندگی قوی‌ای بر رشد *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* می‌باشند. این بازدارندگی بعد از ۴۸ ساعت برای سویه *لاکتوباسیلوس برویس* بیشتر از دیگر سویه‌ها بود. اثر همه تیمارها با نمونه شاهد (بدون باکتری‌های لاکتیکی) دارای اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$)، ولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>0.05$). نتایج مربوط به درصد بازدارندگی بعد از ۷۲ ساعت نیز نشان داد که هر دو جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* (C۶ و C۱۷) نسبت به *انتروکوکوس فاسیوم* (C۸)، اثر بازدارندگی قوی‌تری را علیه *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* از خود نشان دادند و اثر همه تیمارها با نمونه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار ولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. با توجه به نتایج، می‌توان بیان داشت باکتری‌های آزمون شده، پتانسیل جلوگیری از فساد میکروبی مواد غذایی مستعد فساد با کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* به‌ویژه پنیر را به عنوان نگهدارنده‌ای طبیعی و ایمن دارا می‌باشند.

کلمات کلیدی: چال، باکتری‌های اسید لاکتیک، اثر ضد قارچی، *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم*، شناسایی مولکولی.

* khomeiri@gau.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

چال (شیر تخمیری شتر) از جمله محصولات حاصل از شیر شتر می‌باشد که در برخی از نقاط کشور مانند استان گلستان تولید و بعنوان نوشیدنی مصرف می‌شود. شیر شتر محصول سلامتی بخشی است که نه تنها به عنوان یک نوشیدنی غذایی بلکه می‌تواند به دلیل اثرات سلامت بخش آن برای درمان برخی از بیماری‌های خاص مورد استفاده قرار گیرد. وجود آنتی بادی-های ویژه با قابلیت نفوذ قابل توجه به بافت‌های سرطانی، وجود ماده شبه انسولین، وجود پپتیدهای فعال زیستی بدست آمده از پروتئین‌های مختلف شیر شتر با قابلیت آنتی اکسیدانی، آنتی میکروبی و کاهندگی فشار خون که دارای خواص ارزشمند درمانی می‌باشند و همچنین شباهت بی بدیل شیر شتر به شیر انسان بخصوص در عدم داشتن بتا لاکتوگلوبولین و عدم ایجاد آلرژی‌های غذایی در نوزادان و قابلیت جایگزینی آن با شیر مادر، از ویژگی‌های مهم این شیر محسوب می‌شوند (۱-۳). جداسازی و شناسایی دقیق میکروارگانیسم‌ها از منابع طبیعی با روش‌های مولکولی، وسیله‌ای موثر برای دست یابی به گونه‌های ثابت از لحاظ ژنتیکی و استفاده از آنها به عنوان عوامل سلامت بخشی و دارویی است.

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB[1]) نقش اصلی را در فرآیند تخمیر ایفا می‌کنند (۴) و *لاکتوباسیلوس‌ها* از بزرگترین و مهم‌ترین جنس‌های آن‌ها می‌باشند که کاربردهای فراوانی در صنعت و حوزه سلامت دارند و با توجه به این که از لحاظ ایمنی در اروپا مورد تایید و به عنوان مواد ایمن گراس[2] به رسمیت شناخته شده‌اند (۵-۷)، می‌توان از آن‌ها به عنوان ترکیبات طبیعی برای جایگزین کردن با مواد افزودنی شیمیایی (بعنوان نگهدارنده زیستی) و در عین حال ارائه محصولات غذایی و دارویی جدید و جذاب استفاده کرد (۸). نگهدارنده‌های زیستی به صورت "استفاده از میکروارگانیسم‌ها و یا متابولیت‌های آن‌ها برای جلوگیری از فساد، افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی" تعریف می‌شود (۹،۱۰). بر اساس تحقیقات انجام شده، ٪ ۲۵ از رژیم غذایی اروپا و ٪ ۶۰ رژیم غذایی برخی از کشورهای در حال توسعه از غذاهای تخمیری (حاوی نگهدارنده‌های طبیعی) تشکیل شده است.

قارچ‌ها ارگانیسم‌های مهمی در فساد محصولات غذایی و سیستم‌های غذایی می‌باشند که سالیانه بالای ۵ تا ۱۰ درصد از تولیدات مواد غذایی جهان در نتیجه فساد بوسیله آن‌ها از دست می‌رود (۵، ۱۱، ۱۲). برآورد شده است که کپک عامل فساد نان به تنهایی، موجب خسارات اقتصادی سالانه بیش از ۲۰۰ میلیون پوند در غرب اروپا می‌شود (۱۲). همچنین فساد قارچی علاوه بر اتلاف محصول و ضررهای اقتصادی، باعث تولید سموم بسیار خطرناکی نظیر مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی می‌شود. مایکوتوکسین کپک‌ها می‌تواند باعث طیف گسترده‌ای از اثرات منفی نظیر سرطان‌زایی، تراتوژنی، ایمونوتوکسیک، نوروتوکسیک، نفروتوکسیک، مایکوتوکسیکوزیس و بیماری کاشین بک بر روی سلامت انسان شود (۴، ۱۳). لذا حضور مایکوتوکسین در غذاها پتانسیل‌های خطرناکی برای ایجاد بیماری در حیوانات و انسان داشته و می‌تواند مشکلات جدی را از نظر سلامتی و اقتصادی برای انسان بوجود آورد (۴، ۱۴). بر اساس مطالعات گسترده‌ای که در دهه‌های اخیر انجام شده، LAB ها به دلیل تولید ترکیباتی نظیر اسیدهای آلی، کربن دی اکسید، پراکسید هیدروژن، دی استیل، رئوترین و دیگر ترکیبات شناخته شده، دارای طیف گسترده‌ای از خاصیت ضد قارچی در مقابل عوامل فساد و بیماریزای مواد غذایی می‌باشند (۸،۱۰، ۱۲،۱۵،۱۶). با توجه به این که برخی از گونه‌های کپکی به نگهدارنده‌های سنتزی مقاوم شده‌اندو از آنجایی که مضرات استفاده از آن‌ها نظیر تشکیل نیتروز آمین‌های سرطان‌زا در غذاها افزایش یافته و از طرفی تمایل مصرف کنندگان نیز به غذاهای با مقدار مواد نگهدارنده شیمیایی کم و دارای خواص سلامت بخشی (درمانی) به طور چشمگیری افزایش یافته است. لذا

[1] Lactic Acid Bacteria

[2] GRAS

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از LAB ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی برای کنترل کپک‌ها به عنوان یک روش جایگزین قابل توجه برای روش-های فیزیکی و شیمیایی معمول نگهداری مواد غذایی محسوب می‌شود. این پژوهش، با هدف شناسایی دقیق مولکولی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصول تخمیری چال استان گلستان به عنوان یک منبع بکر و قابل بررسی فعالیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس و انتروکوکوس فاسیوم* ایزوله شده به عنوان یک نگهدارنده زیستی بر علیه کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* به عنوان یکی از عوامل فساد میکروبی پنیر انجام شده است. زیرا سویه های مختلف کپک *پنی سیلیوم* و از جمله *کرایسوژنوم* از جمله عوامل اصلی فساد محصولات لبنی هستند.

مواد و روش کار

مواد

موادی که در این پژوهش استفاده شدند شامل محیط کشت‌های MRS براث، MRS آگار، BHI، Y.G.C، PDA، بافر تریس، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید، کلروفرم و آگارز (شرکت مرک آلمان)، مستر میکس و پروتئیناز K (تکاپوزیست ایران) و DNA Safe Stain (فرمتاز امریکا) بودند. همچنین کپک PTCC ۵۰۳۷ *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* عامل فساد محصولات لبنی مورد استفاده در این پژوهش از سازمان پژوهش‌های صنعتی ایران و مرکز کلکسیون میکروبی ایران، تهیه گردید.

روش آماده سازی نمونه های چال

در این پژوهش باکتری‌های اسید لاکتیک از ۹ نمونه شیر تخمیری شتر (چال) که از مناطق مختلف استان گلستان جمع آوری و بوسیله روش‌های بیوشیمیایی جداسازی شده بودند (۲۱)، استفاده گردید. ابتدا نمونه‌های منجمد که در یخچال ۱۸- °C نگهداری می‌شدند. پس از خارج سازی از حالت انجماد بر روی محیط کشت‌های اختصاصی چندین بار فعال سازی شدند.

روش کشت و آزمون‌های ابتدایی شناسایی (تایید اولیه LAB)

به منظور کشت و فعال‌سازی، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت BHI براث کشت داده شدند و در صورت رشد به محیط کشت MRS براث انتقال داده می‌شدند و در نهایت برای رسیدن به تک کلنی خالص به صورت خطی بر روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شدند و در دمای ۳۷ °C گرمخانه گذاری شدند. پس از فعال‌سازی حدود ۱۰ جدایه نگهداری شده چال توسط محیط کشت‌های BHI و MRS براث و خالص سازی آن‌ها، نمونه‌های ناخالص حذف گردیدند و بر روی بقیه نمونه‌ها آزمایش‌های تایید اولیه LAB ها نظیر آزمون گرم و آزمون کاتالاز انجام گرفت. در نهایت در بین همه نمونه‌های فعال‌شده، جدایه‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و بدون اسپور که شامل ۴ گونه بودند به عنوان LAB ها برای شناسایی دقیق مولکولی انتخاب شدند. بقیه گونه‌ها به دلیل آلودگی و یا متعلق بودن به جنس‌های غیر از *لاکتوباسیلوس* از تحقیق حذف شدند.

استخراج DNA از جدایه‌های باکتریایی

به منظور استخراج DNA از کلونی‌های تک خالص سازی شده و از دستورالعمل کیت استخراج DNA (شرکت تکاپو زیست) استفاده گردید.

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR[1])

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با مقادیر بهینه شده‌ی جدول ۱ انجام پذیرفت. پرایمر مورد استفاده جهت تکثیر

[1] Polymerase chain reaction

www.SID.ir

Archive of SID

ژن 16SS rDNA شامل پرایمرهای عمومی باکتری‌های اسید لاکتیک:

F44 (5'RGTTYGATYMTGGCTCAG-3') و R1543 (5'- GNNTACCTTKTTACGACTT-3') بودند (۱۷).

پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوب‌ها در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و برنامه دمایی به شرح **جدول ۲** تنظیم گردید. برای مشاهده نتایج واکنش PCR پس از بارگذاری واکنش‌های PCR در ژل آگاروز ٪ ۱/۵ ، الکتروفورز با ولتاژ V ۹۰ و زمان ۵۰ دقیقه انجام شد. سپس با استفاده از ژل داک عکس ژل گرفته شد و نمونه هایی که باند شارپ نشان دادند تا زمان فرستادن آنها برای توالی یابی در فریزر C° ۱۸- نگهداری شدند.

تعیین توالی و مقایسه توالی‌ها

جهت تعیین توالی جدایه‌های حاصل، محصولات PCR به شرکت بیونیر کره جنوبی ارسال گردید. از پرایمر F44 و R1543 جهت تعیین توالی دو طرفه استفاده گردید. با کمک برنامه BLAST توالی‌های حاصل با توالی‌های موجود در بانک ژنی (NCBI) مقایسه شدند. جدایه‌هایی که توالی آن‌ها با موارد موجود در بانک اطلاعاتی، درصد تشابه بالای ٪ ۹۰ را نشان دادند، به عنوان همان گونه شناسایی شدند.

جدول۱- میزان مواد مورد استفاده در واکنش PCR

مواد	مقدار (µl)
مستر میکس	۱۰
پرایمر رفت	۱،۵
پرایمر برگشت	۱،۵
DNA الگو	۲
آب مقطر	رسیدن به حجم ۲۰
حجم نهایی	۲۰

جدول ۲- مراحل انجام واکنش PCR*

مراحل	دما (°C)	زمان (min)	تعداد سیکل
دناتوره شدن اولیه	۹۵	۵	۱
دناتوره شدن	۹۵	۳۰	
اتصال پرایمر ها	۵۴	۳۰	
طویل شدن(توسعه)	۷۲	۲	۳۳
توسعه نهایی	۷۲	۱۰	۱

* منبع شماره ۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی خصوصیات ضد قارچی سویه‌ها

ابتدا کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم*[1] مورد استفاده در محیط کشت‌های PDA یا YGC فعال‌سازی و به مدت یک تا دو هفته (تا زمان اسپورزایی مناسب) در دمای ۳۰ °C گرمخانه گذاری شد. همچنین سویه‌های باکتریایی ابتدا در محیط کشت MRS براث به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در شرایط بی‌هوازی فعال و مورد استفاده قرار گرفتند (۱۹).

روش دولایه فعال‌سازی و آماده‌سازی سویه‌های باکتریایی

در این روش، کشت‌های فعال شده باکتریایی در محیط براث، یک بار دیگر اما این بار در محیط کشت جامد (MRS آگار) به صورت سطحی کشت و فعال‌سازی صورت گرفت (۴۸ ساعت در دمای ۳۰ °C و در شرایط بی‌هوازی). سپس از کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت جامد، ۲ خط به طول ۳ cm (با فاصله از هم) بر روی محیط کشت MRS آگار کشیده شد. پلیت‌ها برای رشد باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ °C و در شرایط بی‌هوازی، گرمخانه گذاری شدند (۱۹،۲۰).

فعال‌سازی کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* عامل فساد

ابتدا کپک‌ها بر روی محیط کشت‌های PDA یا YGC به‌صورت اسلنت (شیب‌دار) کشت و در دمای ۳۰ °C به مدت یک تا دو هفته (تا زمان اسپورزایی مناسب) در دمای ۳۰ °C گرم‌خانه گذاری شدند. سپس سطح کپک‌ها با توین ۸۰ نیم درصد شستشو داده شد و میزان ۱۰ µl از آن با سمپلر برداشته و با استفاده از لام هموسایتومتر مورد شمارش قرار گرفت. بعد از سه بار شمارش با لام هموسایتومتر از میانگین آن‌ها برای دقیق‌تر بودن مقدار اسپور تلقیحی استفاده شد. سوسپانسیون 10^4 اسپور در میلی‌لیتر از هر کدام از کپک‌ها در لوله فالکون آماده گردید(۲۰،۲۱).

بعد از رشد کلنی‌های باکتریایی بر روی خطوط با طول ۳cm ، ml ۱۰ محیط کشت عصاره مالت آگار نرم (٪ ۰/۵ عصاره مالت و ٪ ۱ آگار) که میزان 10^3 cfu اسپور در میلی‌لیتر آن وجود داشت، به صورت آرام بر روی پلیت‌های شامل باکتری‌ها (با خطوط cm ۳) ریخته شد و اجازه داده شد تا محیط کشت کاملاً ببندد. بعد از بستن محیط کشت، پلیت‌ها در دمای ۳۰ °c و در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شدند. بعد از h ۴۸، ۷۲، ۹۶ و همچنین تا زمانی که میزان بازدارندگی به صفر نزدیک می‌شد، قطر هاله بازدارندگی از رشد خطوط ۳ سانتی‌متری اندازه‌گیری شد. میزان بازدارندگی به‌صورت زیر گزارش شد (۱۹،۲۰).

- عدم بازدارندگی در اطراف خطوط ۳ سانتی‌متری

+ بازدارندگی ضعیف، هیچ قارچی در ناحیه ٪ ۳-۰/۵ خطوط باکتریایی رشد نکرده است.

++ بازدارندگی متوسط، هیچ قارچی در ناحیه ۸-۳ درصد خطوط باکتریایی رشد نکرده است.

+++ بازدارندگی قوی، هیچ قارچی در ناحیه > ٪ ۸ خطوط باکتریایی رشد نکرده است.

نتایج

نتایج شناسایی مولکولی

پس از انجام آزمون‌های ابتدایی در بین همه نمونه‌های فعال‌شده، جدایه‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و بدون اسپور که به عنوان LAB ها برای شناسایی دقیق مولکولی انتخاب شدند و بقیه گونه‌ها به دلیل آلودگی و یا متعلق بودن به جنس‌های غیر از *لاکتوباسیل* از تحقیق حذف شدند. پس از انتقال آمپلیکون-های حاصل از محصول PCR بر روی ژل الکتروفورز مطابق شکل ۱، تمامی آن‌ها طولی معادل bp ۱۴۰۰ داشتند. با توجه به ایجاد باندهای قوی در ژل الکتروفورز کیفیت DNA استخراج

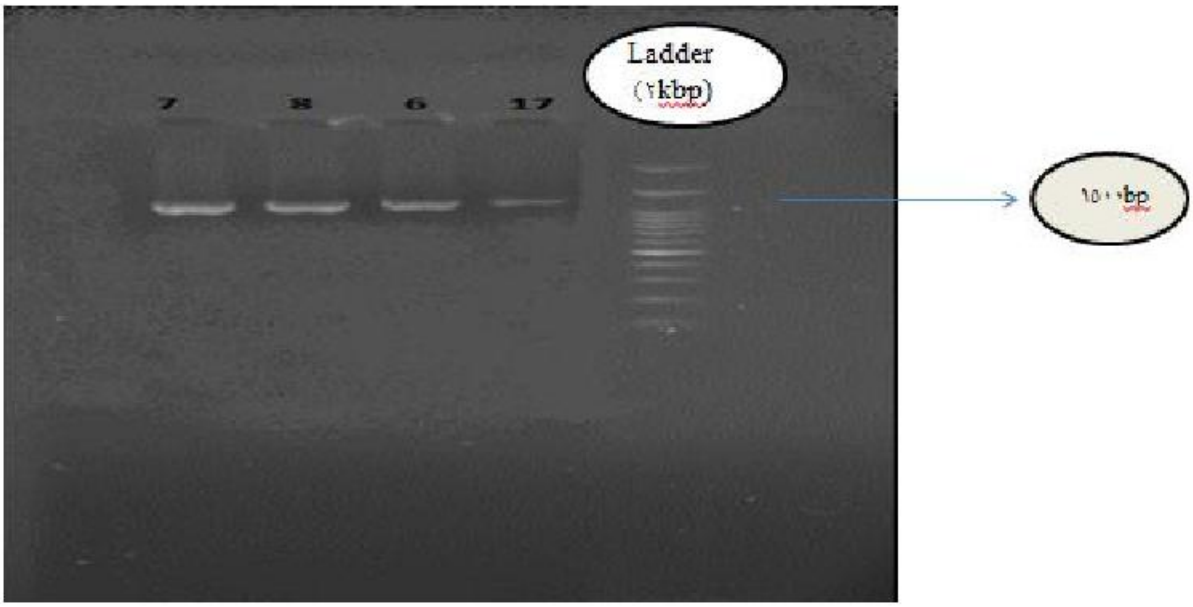
[1] Penicillium chrysogenum

www.SID.ir

Archive of SID

شده مورد تایید قرار گرفت. شکل ۱ تصویر آمپلیکون‌های bp ۱۵۰۰ حاصل از واکنش PCR 16S rDNA در ژل الکتروفورز را نشان می‌دهد.

نتایج توالی‌یابی محصولات PCR پس از ویرایش با نرم افزار BioEdit و ارزیابی همردیفی به کمک رویه BLASTN با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI منجر به شناسایی جدایه‌های موردنظر شد و نتایج شناسایی مولکولی در جدول ۳ مشاهده می‌شود.



شکل۱- تصویر آمپلیکون های bp ۱۵۰۰ حاصل از واکنش PCR 16S rDNA در ژل الکتروفورز

جدول ۳- مقایسه روش شناسایی بیو شیمیایی و مولکولی (بر اساس ناحیه 16 S rDNA) باکتری‌های جداشده

کد سویه	نام باکتری (شناسایی بیوشیمیایی)*	نام باکتری (شناسایی مولکولی)	درصد تشابه	شماره دسترسی
C٦	*Lactobacillus brevis*	*Lactobacillus brevis*	۹۷	NR_075024.1
C۷	*Lactobacillus alimentarius*	*Enterococcus hirae*	۹۶	NR_ 0755022.1
C۸	*Pediococcus pentosaceus*	*Enterococcus faecium*	۹۰	NR_114742.1
C۱۷	*Lactobacillus gasseri*	*Lactobacillus brevis*	۹۳	NR_075024.1

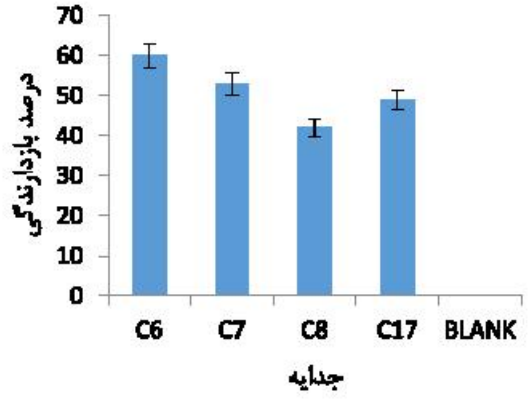
* نتایج این بخش در منبع شماره ۲۲ گزارش شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج اثر بازدارندگی سویه‌ها با استفاده از روش دو لایه علیه *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم*

خاصیت ضد قارچی سویه‌های مورد نظر در برابر کپک عامل فساد محصولات لبنی *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* با استفاده از روش دو لایه مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۲، ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، هر دو باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* و سویه *انتروکوکوس فاسیوم* مورد آزمون بر روی کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم*، اثر بازدارندگی قوی‌ای را از خود نشان دادند که این بازدارندگی بعد از ۴۸ ساعت برای سویه لاکتوباسیلوس برویس بیشتر از ما بقی سویه‌ها بود و همه تیمارها با نمونه شاهد (بدون باکتری لاکتیکی) اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$) ولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P>0/05$).



شکل ۲- درصد بازدارندگی باکتری‌های لاکتیکی در محیط کشت علیه کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* بعد از ۴۸ ساعت

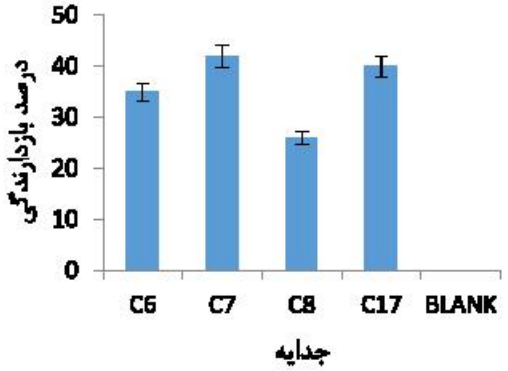
شکل۳- اثر بازدارندگی جدایه C6 علیه کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* در محیط کشت بعد از ۴۸ ساعت در مقایسه با شاهد (سمت راست نمونه شاهد بدون استفاده از *لاکتوباسیلوس برویس* و سمت چپ استفاده از *لاکتوباسیلوس برویس* در محیط)

شکل۶- اثر بازدارندگی جدایه C6 علیه کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* در محیط کشت بعد از ۷۲ ساعت در مقایسه با شاهد (سمت راست نمونه شاهد بدون استفاده از *لاکتوباسیلوس برویس* و سمت چپ در حضور *لاکتوباسیلوس برویس* در محیط)

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین نتایج حاصل از درصد بازدارندگی بعد ۷۲ ساعت (شکل۵ و ۶) نیز نشان داد که هر دو سویه *لاکتوباسیلوس برویس* (C۶ و C۱۷) نسبت به سویه *انتروکوکوس فاسیوم* (C۸) بعد از گذشت ۷۲ ساعت، اثر بازدارندگی قویتری را علیه کپک پنی-*سیلیوم کرایسوژنوم* از خود نشان دادند و همه تیمارها با نمونه شاهد (بدون بازدارندگی) اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$) ولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P>0/05$) (۲۳).



شکل۵- درصد بازدارندگی باکتری‌های لاکتیکی در محیط کشت علیه کپک پنی‌*سیلیوم کرایسوژنوم* بعد از ۷۲ ساعت

بحث

در سال‌های اخیر پژوهشگران زیادی LAB و *لاکتوباسیلوس*ها را از محصولات سنتی و بومی در سراسر دنیا به خصوص در مناطق بکر جداسازی و شناسایی نموده‌اند (۲۴-۲۶). از طرفی با توجه به نقش قارچ‌ها در تخریب و ایجاد بیماری‌های ناشی از مواد غذایی و همچنین افزایش مقاومت کپک‌ها به نگهدارنده‌های سنتزی و علاقه زیاد به بهبود و افزایش ایمنی مواد غذایی از طریق جایگزینی سیستم‌های نگهداری مرسوم با جایگزین‌های طبیعی، لذا می‌توان از LAB ها به عنوان ارگانیسم‌های ایمن و دارای خاصیت سلامت بخشی به عنوان یک روش جایگزین قابل توجه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی معمول نگهداری مواد غذایی در مقابله به عوامل فسادزای قارچی استفاده کرد.

چال نیز یکی از محصولات بومی استان گلستان می‌باشد که به دلیل وجود انواعی از LAB ها، پتانسیل بالقوه‌ای از نظر میکروارگانیسم‌های سلامتی بخش و صنعتی دارد. بنابراین با توجه به مزایای این میکروارگانیسم‌های ارزشمند از نظر سلامتی بخشی و تکنولوژیکی و نظر به اینکه اکثر کارهای انجام شده در این زمینه در کشور از نظر بیوشیمیایی و مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است لذا شناسایی دقیق این سویه‌ها در چال و معرفی و ثبت گونه‌های بومی مناسب جهت استفاده صنعتی بعنوان آغازگر در کارخانجات صنایع لبنی (با توجه به وارداتی بودن بیش از ۹۰ درصد نیاز کشور) و همچنین بکارگیری آنها بعنوان نگهدارنده طبیعی برای جایگزینی با نگهدارنده‌های سنتزی امری ضروری است که در تحقیق حاضر سعی شده است تا حدودی به این هدف جامه عمل پوشانیده شود.

در تحقیق حاضر، جدایه شماره ۶ با تشابه ٪ ۹۷ به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس*، جدایه شماره ۷ با تشابه ٪ ۹۶ به عنوان *انتروکوکوس هیرایی*، جدایه شماره ۸ با میزان شباهت ٪۹۰به عنوان *انتروکوکوس فاسیوم* و جدایه شماره ۱۷ با میزان شباهت٪ ۹۴ به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس* شناخته شدند که این نتایج در شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌ها به ترتیب به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس الیمنتاریوس*، *پدیوکوکوس پنتازئوس* و *لاکتوباسیلوس گازری* گزارش شده بود.

در بیشتر تحقیقات انجام گرفته بر روی محصولات لبنی در نقاط دنیا همانند آنچه در تحقیق حاضر مشاهده گردید، سویه های لاکتوباسیلوس جداسازی شدند و این سویه جز سویه های غالب محسوب می‌شود همانند تحقیق تروپچیوا و همکاران که به شناسایی *لاکتوباسیلوس*های جدا شده از محصول لبنی محلی کاتاک با روش مولکولی پرداختند که چهار سویه جدا شده مربوط به گونه *لاکتوباسیلوس برویس* بودند (۲۶). همچنین

www.SID.ir

Archive of SID

آشمایگ و همکاران از گاریس که یک نوع دیگر از محصول تخمیری شیر شتر در سودان است گونه‌های مختلفی از *لاکتوباسیلوس* را شناسایی کردند که نوع گونه‌های شناسایی شده بسته به هر منطقه متفاوت بوده است. از جمله گونه‌های شناسایی شده توسط آن‌ها می‌توان به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس برویس* اشاره کرد (۲۴) و در تحقیق دیگری نتایج حاصل از بررسی ناندا و همکاران بر روی شناسایی مولکولی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از پنیر تولیدشده با شیر شتر در هند نشان داد که *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و بعد از آن‌ها *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* سویه‌های غالب بودند (۲۵). بنابراین بر اساس نتایج ما و نتایج سایر محققان اگر چه شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی بر پایه الگوی تخمیر قندها، وسیله‌ای مناسب جهت شناسایی باکتری‌هاست اما این روش شناسایی همیشه دقیق و قابل اعتماد نیست (۲۷-۲۹).

گونه *پنی‌سیلیوم*، شایع ترین گونه موجود در فساد پنیر بوده و سموم آن عمدتا در پنیر شناخته شده می‌باشند. این سموم شامل راکفورتین C، ایزو فومیگا کالوین A ، سیکلوپیازونیک اسیدو سم PR می‌باشند (۳۰). اما نکته قابل توجهی که در سال‌های اخیر به طور جدی مطرح شده است، افزایش تعداد گونه‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی بیوتیک‌ها می‌باشد. هم‌چنین نشان داده شده است که تعدادی از گونه‌های *پنی‌سیلیوم*، *ساکارومایسس* و *زایگو ساکارومایسس* می‌توانند در حضور موربات پتاسیم رشد کنند (ص ۲۰، ۳۱). نیتروز آمین سرطان‌زا از دیگر مواد خطرناکی است که در اثر مصرف نگهدارنده‌های سنتزی در غذاها اتفاق می‌افتد (۳۲). بر اساس آنچه که ذکر شد، تعداد قارچ‌هایی که به نگهدارنده‌های سنتزی مقاوم بوده و توانایی متابولیزه کردن این ترکیبات به مواد خطرناک برای سلامتی را دارند، رو به افزایش است. علاوه بر این، نگرانی‌های اخیر مصرف کنندگان در مورد ایمنی مواد غذایی و تقاضا برای غذاهای طبیعی، ضرورت این امر را بیشتر کرده است (ص ۳۳).

همچنین در بخش دیگر این تحقیق به بررسی فعالیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس برویس* ایزوله شده بر علیه *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* به عنوان یکی عوامل فساد پنیر پرداخته شد که دو باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* مورد آزمون بر روی کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم*، اثر بازدارندگی قوی‌ای را بعد ۴۸ و ۷۲ ساعت از خود نشان دادند.

در طول چند سال گذشته، بسیاری از محققان دریافته‌اند که سویه‌های LAB می‌توانند، رشد کپک و مخمرها را مهار کنند. به عنوان مثال مهی الدین همکاران در سال ۲۰۱۱، نشان دادند که چهار سویه اسید لاکتیک باکتری شامل *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* Te007، *لاکتوباسیلوس پنتوسئوس* G004، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* D5 و *پدیوکوس پنتوسئوس* در مقابل *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس اوریزا* خاصیت بازدارندگی از خود نشان می‌دهند (۲۱).

همچنین در تحقیق دیگری فعالیت ضد قارچی ترکیبی از کشت‌های *پروپیونی باکتریوم جنسنی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیر گونه پاراکازئی* بر علیه قارچ‌هایی نظیر *کاندیدا پولکریما*، *کاندیدا ماگنولیا*، *کاندیدا پارایسیلوس* و *زایگو ساکارومایسس بایلی* در ماست و پنیر نیز گزارش شده است(۳۴).

در تحقیقی دیگر، لی و همکاران، فعالیت ضد قارچی و اثر *لاکتوباسیلوس کازئی* را بر روی مورفولوژی میسلا و ساختار *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها همانند نتایج تحقیق حاضر نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* از رشد *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* جلوگیری می‌کند. علاوه بر این نتایج آن‌ها نشان داد که مورفولوژی میسلای کپک نیز در اثر این باکتری تغییر پیدا کرد. عکس‌های میکروسکوپ الکترونی نیز نشان داد، زمانی که *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* در برابر *لاکتوباسیلوس کازئی* قرار می‌گیرد، میسلا متلاشی شده و از لحاظ ظاهری تغییر پیدا می‌کند و در بررسی دیگری که ولگاری و همکاران بر روی فعالیت ضد قارچی لاکتیک اسید باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

غیر استارتری از جمله گونه *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* جدا شده از محصولات لبنی علیه کپک پنی-*سیلیوم کاندیدیوم* و مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که بیش از ٪ ۴۰ از جدایه علیه گونه‌های شاخص خاصیت بازدارندگی رشد از خود نشان دادند (۱۶، ۲۰).

همچنین نتایج حاصل از بررسی سیزیکین و همکاران بر روی فعالیت ضد قارچی *لاکتوباسیلوس ساکی* و *پدیوکوس پنتوسئوس* علیه کپک‌های *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* و *پنی‌سیلیوم ایکسپانسوم* نشان داد که اثر کشندگی و ممانعت کنندگی این باکتری‌ها به علت متابولیت‌های تولیدی آن‌ها می‌باشد و این اثر ممانعت کنندگی برای قارچ‌های عامل فساد تا ۸ روز بود که در تحقیق حاضر هم باکتری‌های مذکور تا بیش از ۳ روز توانستند رشد کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* را به تعویق انداخت (۳۴،۳۵).

بر اساس نتایج تحقیقاتی که در این زمینه انجام گرفته است، خاصیت ضد قارچی این باکتری‌ها به دلیل وجود، اسیدهای آلی (مانند اسید لاکتیک، اسید فرمیک، اسید استیک، اسید کاپروئیک، اسید فنیل لاکتیک)، کربن دی اکسید، پراکسید هیدروژن، دی استیل، اتانول، اسیدهای چرب هیدروکسیل، دی پپتیدهای حلقوی، ترکیبات پروتئینی، رئوترین و رئوتری‌سیلین، می‌باشد که بوسیله LAB ها تولید می‌شوند (۱۰، ۱۶، ۳۶). به عنوان مثال در تحقیقی کرولی و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که دو دی پپتید حلقوی، سایکلو (LPhe-L-Pro) و سایکلو (Phe-trans-4-OH-L-Pro(L-، نیز در مقابل کپک‌ها فعالیت بازدارندگی ایجاد می‌کنند. حداقل غلظت بازدارندگی(MIC[1]) برای سایکلو (LPhe-L-Pro) بر علیه *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *پنی‌سیلیوم راکفورتی*، gr/ml ۲۰ تعیین شده است. (۳۷). در تحقیق دیگری لاورمیکوکا همکاران فنیل لاکتیک اسید را از محلول رویی (سوپرناتانت) *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B 21 جداسازی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که تخمیر خمیر ترش آغاز شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، برای حداقل هفت روز فساد ایجاد شده به وسیله قارچ *آسپرژلوس اوریزا* FTDC3227 را به تاخیر می‌اندازد؛ در حالی که نمونه شاهد اجازه رشد به این گونه عامل فساد تنها پس از دو روز می‌دهد (۳۸). همچنین نشان داده شده است که فنیل لاکتیک اسید رشد مایکوتوکسین تولید شده بوسیله کپک‌های پخت (سویه های *پنی‌سیلیوم ورسسیوم* و *پنی‌سیلیوم سیترینوم*) را به تاخیر می اندازد (۳۷).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از بخش شناسایی ژنتیکی نشان داد که باکتری‌های غالب جداشده از چال شامل دو نژاد از *لاکتوباسیلوس برویس* (C۶، C۱۷) یک نژاد *انتروکوکوس هیرایی* C۷ و یک نژاد *انتروکوکوس فاسیوم* C۸ بودند که بجز از یک جدایه، مابقی جدایه‌ها با نتایج حاصل از شناسایی بیوشیمیایی کاملا متفاوت بودند که این بیانگر عدم دقت و غیر قابل اطمینان بودن این روش‌ها و لزوم استفاده از روش‌های مولکولی در تحقیقات مختلف را به خوبی نشان می‌دهد. همچنین نتایج حاصل از فعالیت ضد قارچی نشان داد که هر دو جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* (C۶، C۱۷) و جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* C۸ مورد آزمون بر روی کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم*، اثر بازدارندگی قوی‌ای را از خود نشان دادند که این بازدارندگی بعد از ۴۸ ساعت برای سویه *لاکتوباسیلوس برویس* C۶ بیشتر از ما بقی سویه‌ها بود و همه تیمارها با نمونه شاهد (بدون بازدارندگی) اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0.05$) ولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند ($P>۰/۰۵$). نتایج حاصل از درصد بازدارندگی بعد ۷۲ ساعت نیز نشان داد که هر دو سویه *لاکتوباسیلوس برویس* (C۶ و C۱۷) نسبت به سویه *انتروکوکوس فاسیوم* (تیمار۷) بعد از گذشت ۷۲ ساعت، اثر بازدارندگی قوی‌تری را علیه کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* از خود نشان دادند و همه تیمارها با نمونه شاهد

[1] Minimum inhibitory concentration

www.SID.ir

Archive of SID

اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ($P<0/05$) ولی با یکدیگر اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند.

بنابراین با توجه به نتایج حاصله می‌توان از LAB چال برای جلوگیری از فساد میکروبی مواد غذایی مستعد فساد با کپک *پنی‌سیلیوم کرایسوژنوم* به‌ویژه در پنیر به عنوان نگهدارنده طبیعی و ایمن استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور بخاطر تامین بودجه این تحقیق اعلام داشته و از خانم دکتر رمضانپور، خانم‌ها مهندس ابراهیمی و مهندس محمودی به دلیل همکاری‌هایی که در انجام این تحقیق داشته‌اند کمال تقدیر و تشکر را دارند.

منابع

1. Panwar R, Grover CR, Kumar V, Ranga S, Kumar N. Camel milk: Natural medicine-Boon to dairy industry. 2015.
2. Sharma C, Singh C. Therapeutic value of camel milk–a review. Advanced Journal of Pharmacie and Life science Research. 2014;2(3):7-13.
3. Stahl T, Sallmann H-P, Duehlmeier R, Wernery U. Selected vitamins and fatty acid patterns in dromedary milk and colostrum. Journal of camel practice and research. 2006;13(1):53-7.
.4 Pawlowska AM, Zannini E, Coffey A, Arendt EK. 5" Green Preservatives": Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. Advances in food and nutrition research. 2012;66:217.
.5 Schnürer J, Magnusson J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science & Technology.۸-۷۰:(۱)۱۶;۲۰۰۵ .
.6 Ljungh A, Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics. Current issues in intestinal microbiology. 2006;7(2):73-90.
.7 Li H, Liu L, Zhang S, Uluko H, Cui W, Lv J. Potential use of Lactobacillus casei AST18 as a bioprotective culture in yogurt. Food Control. 2013;34(2):675-80.
8. Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology. 2004;15(2):67-78.
9.Muhialdin BJ, Hassan Z. Screening of lactic acid bacteria for antifungal activity against Aspergillus oryzae. American Journal of Applied Sciences. 2011;8(5):447.
10. Cortés-Zavaleta O, López-Malo A, Hernández-Mendoza A, García H. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. International journal of food microbiology. 2014;173:30-5.
11. Rouse S, Harnett D, Vaughan A, Sinderen Dv. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. Journal of Applied Microbiology. 2008;104(3):915-23.
12. Yang E, Chang H. Purification of a new antifungal compound produced by Lactobacillus plantarum AF1 isolated from kimchi. International journal of food microbiology. 2010;139(1):56-63.
13. Sengun I, Yaman D, Gonul S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. World Mycotoxin Journal. 2008;1(3):291-8.
14. Gerez C, Torres M, de Valdez GF, Rollán G. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. Biological Control. 2013;64(3):231-7.
15. Zhang J, Wang X-J, Yan Y-J, Jiang L, Wang J-D, Li B-J, et al. Isolation and identification of 5-hydroxyl-5-methyl-2-hexenoic acid from Actinoplanes sp. HBDN08 with antifungal activity. Bioresource technology. .۸-۸۳۸۳:(۲۱)۱۰۱;۲۰۱۰
16. Li H, Zhang S, Lu J, Liu L, Uluko H, Pang X, et al. Antifungal activities and effect of Lactobacillus casei AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of Penicillium chrysogenum. Food Control. 2014;43:57-64.
17. Abnous K ,Brooks SP, Kwan J, Matias F, Green-Johnson J, Selinger LB, et al. Diets enriched in oat bran or wheat bran temporally and differentially alter the composition of the fecal community of rats. The Journal of nutrition. 2009;139(11):2024-31.
18. Leite, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B. and Delgado, S. 2015. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains

www.SID.ir

Archive of SID

journal of food microbiology. 2003;80(3):201-10.
28. De Angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo M, Gobbetti M. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(5):2011-20.
29. Nigatu A. Evaluation of numerical analyses of RAPD and API 50 CH patterns to differentiate Lactobacillus plantarum, Lact. fermentum, Lact. rhamnosus, Lact. sake ,Lact. parabuchneri, Lact. gallinarum, Lact. casei, Weissella minor and related taxa isolated from kocho and tef. Journal of applied microbiology. 2000;89(6):969-78.
30. Nielsen MS, Frisvad JC, Nielsen PV. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. International journal of food microbiology. 1998;42(1):91-9.
31. Davidson P. Food microbiology–fundamentals and frontiers. Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds"(Eds Doyle, MP. 2001:593-627.
32 Fernandes C ,Shahani K, Amer M. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. FEMS Microbiology Reviews. 1987;3(3):343-56.
33.Ahmadova A, Todorov SD, Hadji-Sfaxi I, Choiset Y, Rabesona H, Messaoudi S, et al. Antimicrobial and antifungal activities of Lactobacillus curvatus strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. Anaerobe. 2013;20:42-9.
34. Lynch KM, Pawlowska AM, Brosnan B, Coffey A, Zannini E, Furey A, et al. Application of Lactobacillus amylovorus as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. International Dairy Journal. 2014;34(1):167-73.
35.Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius 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(2):539-45.
36. Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology reviews. 1990;7(1-2):175-88.
isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science, 6, 3622-3632.
19.Magnusson J, Schnürer J. Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology. 2001;67(1):1-5.
20. Voulgari K, Hatzikamari M, Delepoglou A, Georgakopoulos P, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. Food Control. 2010;21(2):136-42 .
21. Muhialdin BJ, Hassan Z, Sadon SK. Antifungal Activity of Lactobacillus fermentum Te007, Pediococcus pentosaceus Te010, Lactobacillus pentosus G004, and L. paracasi D5 on Selected Foods. Journal of food science. 2011;76(7):M493-M9
22. Zarei yam, B., Khomeiri, M., Sadeghi mahonak, A.R., and Jafari, S.M., 2012, Isolation and identification of lactic acid bacteria from a hole in Golestan Province. Electronic Journal of Food Processing and Preservation (in persian), 5(2): 131-148
23. Nasrollahzadeh A, morteza Khomeiri M, SadeghiA, Kashaninejad M. 2016. Survey antifungal activity of *Lactobacillus* isolated against mold *Penicillium chrysogenum* as one of agents the microbial spoilage of cream cheese. *Iran. J. Public Health*, Vol. 45, Supplementary Issue, No. 2,.Proceedings of "The 16th International and Iranian Congress of Microbiology" Tehran, Iran, 25-27 Aug 2015
24. Ashmaig A ,Hasan A, El Gaali E. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camels milk (Gariss). African Journal of Microbiology Research. 2009;3(8):451-7.
25. Nanda DK, Tomar SK, Singh R, Mal G, Singh P, Arora DK, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of Lactobacilli isolated from camel cheese produced in India. International journal of dairy technology. 2011;64(3):437-43.
26. Tropcheva R, Nikolova D, Evstatieva Y, Danova S. Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product "katak". Anaerobe. 2014;28:78-84.
27. Muyanja C, Narvhus J, Treimo J, Langsrud T. Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. International

www.SID.ir

Archive of SID

37. Crowley S, Mahony J, van Sinderen D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. Trends in Food Science & Technology. 2013;33(2):93-109.
38. Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B. Applied and Environmental Microbiology. 2000;66(9):4084-90.

www.SID.ir

Archive of SID

Molecular identification of Lactic Acid Bacteria strains isolated from Chal in Golestan province and study of antifungal activity of *Lactobacillus brevis* and *Enterococcus faecium* isolates against *Penicillium chrysogenum*

Nasrollahzadeh A.[1], Khomeiri M.[*1], Sadeghi A.[1]

[1] Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

The aim of this study was to identify the LAB strains isolated from Chal by the molecular method and to study antifungal activity of *Lactobacillus brevis* and *Enterococcus faecium* isolates as a biological preservative against *Penicillium chrysogenum*. The LAB isolates were identified using PCR technique with universal primers of LAB, sequencing of PCR products and comparing the sequencing results with the data available in NCBI. The antifungal effects were determined using overlay method to investigate the potential application of tested isolates as a biological preservative agent. Analysis of 16S rDNA gene sequences revealed two strains as *L. brevis*, one *E. hirae* and one *E. faecium*. The results of antifungal activity showed that both isolates of *L. brevis* and *E. faecium* had a strong inhibitory effect against *P. chrysogenu* so that the growth inhibition, after 48 hours, for strain C6 was more than the other strains. All treatments showed significant differences ($P<0.05$) with the control samples but were not significantly different ($P>0.05$) between treatments samples. Inhibitory percentage of both strains of *L. brevis* (C6 and C17) against *P. chrysogenum* was stronger than the strain of *E. faecium* (C8) against the mold. All treatments showed significant differences ($P<0.05$) with control samples but there were no significant differences ($P>0.05$) between the treatments samples. According to the results from present work can conclude that the tested isolates have a potential ability to prevent the microbial spoilage, in foods such as cheese that susceptible to spoil with *P. chrysogenum*, as natural and safe bio-preservative.

Keywords: Chal; Lactic Acid Bacteria; Antifungal effect; *Penicillium chrysogenum*; Molecular identification.

* khomeiri@gau.ac.ir

www.SID.ir