بررسی تنوع جمعیتی باکتری های اسید لاکتیک آش کارده با استفاده از روش تکثیر ژن 16S rRNA و تعیین فعالیت ضد میکروبی ترکیبات شبه باکتریوسینی

فریده طباطبایی یزدی[1*]، علیرضا وسیعی[2]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، سید علی مرتضوی[3]، فروزان طباطبایی یزدی[4]

۱- دانشیار و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- عضو گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۸ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۸)

چکیده

هدف از این پژوهش شناسایی فلور لاکتیکی آش کارده به عنوان یک ماده غذایی سنتی-تخمیری، و سپس بررسی فعالیت ضد میکروبی برخی از سویه‌ها بود. در مجموع ۱٤۰ جدایه گرم مثبت و کاتالاز منفی انتخاب و برای گروه‌بندی آن‌ها، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و تخمیر کربوهیدرات (۱۰ نوع متفاوت) انجام پذیرفت، بر اساس نتایج به دست آمده ۱٤۰جدایه به ۹ گروه تقسیم‌بندی شدند. از هر گروه چند جدایه انتخاب و ژن ناحیه 16SrRNA آن-ها به کمک پرایمرهای عمومی و با تکنیک PCR تکثیر داده شد. تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک آش کارده شامل: لاکتوباسیلوس *فرمنتوم* (٪۳۰/۰۰)، لاکتوباسیلوس *پلانتاروم* (٪۲۸/۵۷)، لاکتوباسیلوس *برویس* (٪۱۵/۰۰)، *ویسلا سیبایریا* (٪۸/۵۷)، *انتروکوکوس فاسیوم* و *فکالیس* (٪۷/۱٤)، *لوکونوستوک سیترئوم* و *مزنتروئیدوس* زیرگونه *مزنتروئیدوس* (٪٦/٤۲) و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* (٪٤/۲۸) بود. فعالیت بازدارندگی بیست جدایه باکتری اسید لاکتیک به دست آمده از آش کارده در مقابل باکتری‌های شاخص بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. شانزده جدایه در روش نقطه گذاری و ۱٤ جدایه در روش نفوذ در چاهک در برابر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص خاصیت بازدارندگی از خود نشان دادند. پنج جدایه که شامل گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* (۱)، *انتروکوکوس فکالیس* (۱)، *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* (۱) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۲) بیشترین اثر آنتاگونستی را بر باکتری شاخص *لیستریا اینوکوآ* نشان دادند. فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای بالاترین مقاومت حرارتی بود. همچنین دو جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* و *فکالیس* فعالیت خود را در pH خنثی حفظ کرده بودند. فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت تنها سویه‌ای که تحت تاثیر آنزیم پروتئیناز K قرار نگرفت، مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود. نتایج نشان می‌دهند از سوپرناتانت برخی جدایه‌های مورد آزمون قرار گرفته می‌توان به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در محصولات غذایی استفاده نمود.

کلید واژگان: آش کارده، باکتری‌های اسید لاکتیک، 16S rRNA، اثر بازدارندگی، باکتریوسین

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

به صورت سنتی غذاهای تخمیری برای افزایش زمان ماندگاری تولید می‌شوند. امرزه طیف وسیعی از غذاهای تخمیری در سراسر دنیا تولید و مصرف می‌شود که خصوصیت آنها بستگی به مواد اولیه، نوع افزودنی ها و شرایط تخمیر دارد [۱]. همانند بسیاری از کشورهای خاورمیانه، ایران سابقه طولانی در تولید غذاهای تخمیری دارد که اغلب به صورت فصلی تهیه و مصرف می‌شود. آش کارده یکی از انواع آش‌های ایرانی است که در محدوده جنوب غربی زاگرس پخته می‌شود و در مناطق مختلف روش‌های پخت متفاوتی دارد. طرز تهیه آش کارده در خوزستان به این صورت است که ابتدا، کاردین (گیاه محلی که در تهیه این غذا استفاده می شود) را همراه با آرد گندم می‌کوبند، سپس با اضافه کردن دوغ به مدت دو روز در محیطی گرم نگه داری می کنند. به آن برنج پخته شده اضافه می‌کنند و در انتها پیاز سرخ شده را به آن می‌افزایند. فرایند تولید آش کارده به صورت سنتی و خود به خودی می‌باشد که توسط میکروارگانیسم هایی آغاز می‌شود که به صورت اتفاقی در اجزای اولیه وجود دارند و عمدتا مربوط به باکتری های خانواده اسید لاکتیک می‌باشند. باکتری‌های متعلق به این خانواده گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیر اسپورزا، مقاوم به اسید، بی هوازی اختیاری و به شکل کوکسی یا باسیل که اسید لاکتیک را به عنوان محصول نهایی و اصلی تخمیر کربوهیدرات‌ها تولید می‌کنند.باکتری های اسید لاکتیک، احتمالاً فراوان ترین گروه از باکتری های مرتبط با انسان هستند [۲]. خاستگاه ذاتی این باکتری ها سطوح موکوسی، به خصوص لوله و دستگاه گوارش انسان همچنین مواد غذایی مرتبط با گیاهان (میوه ها، سبزی ها و دانه های غلات) و شیر و گوشت می باشند [۳]. از آنجایی که کاربرد روش‌های فنوتیپی در شناسایی باکتری‌ها بسیار وقت‌گیر و طولانی است و نتایج حاصل عموما از دقت بالایی برخوردار نمی‌باشد و نمی‌تواند به طور کامل و دقیق باکتری‌ها را در سطح گونه تفکیک نماید، لذا بهتر است جهت شناسایی باکتری‌ها از روش‌های مولکولی استفاده شود. امروزه استفاده از روش‌های مولکولی و مخصوصا روش آنالیز ژن 16S rRNA در جداسازی و شناسایی میکروبی گسترش زیادی پیدا کرده است [٤]. باکتری های اسید لاکتیک توانایی تولید ترکیبات بازدارنده از جمله اسید لاکتیک، دی استیل، استالدهید، هیدروژن پراکسید و باکتریوسین را دارا می‌باشند. باکتریوسین‌ها، پپتیدهایی با خاصیت ضدمیکروبی می‌باشند. این مولکول‌ها عوامل تاثیر گذار بر سیستم ایمنی بوده که عمدتاً تاثیر خود را از طریق برهمکنش با غشا سلول زنده و در نتیجه نابودی سلول میکروبی اعمال می نمایند.این پپتیدها از طریق ریبوزوم سنتز می‌گردند [٥]. باکتریوسین ها بر اساس خواص بیوشیمیایی و ویژگی‌های ژنتیکی در سه گروه اصلی طبقه بندی می‌شوند: لانتی بیوتیک‌ها[1] که خود به دو نوع A و B تقسیم می‌شود که نوع A مولکول‌های خطی و نوع B مولکول-های کروی دارند، باکتریوسین‌های پپتیدی و مقاوم به گرما که سه نوع a، b و c می‌باشند، و گروه سوم که باکتریوسین‌های پروتئینی هستند [٦]. هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک آش کارده با استفاده از روش های مبتنی بر کشت و مولکولی، بررسی تاثیر ترکیبات ضد میکروبی باکتریوسینی یا شبه باکتریوسینی این سویه‌ها بر روی باکتری های شاخص پاتوژن و در نهایت بررسی اثر برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مانند درجه حرارت های مختلف، سطوح مختلف pH و اثر آنزیم پروتئیناز K بر روی مقاومت این ترکیبات می می‌باشد.

۲- مواد و روش

۲-۱- جداسازی، طبقه بندی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

این پژوهش آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۳، در دانشکدهکشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد انجام پذیرفت. در این مطالعه ابتدا ۱۵ نمونه آش کارده از استان خوزستان تهیه شد (با رعایت شرایط استاندارد). ده گرم از نمونه به ۹۰ میلی لیتر از آب پپتون ۰/۱٪ منتقل (مرک، آلمان) و پس از هموژنیزه کردن (مدل Seaward، آلمان) کشت سطحی از رقت‌های مختلف بر روی محیط کشت MRS Agar در دو تکرار انجام شد. به این ترتیب که روی هر پلیت ۱۰۰میکرولیتر از هر رقّت ریخته و پخش شد. در دو دمای ۳۰ و ٤٥ درجه سانتی گراد به مدت ٤٨ ساعت در شرایط بی

1. Lantibiotic

Archive of SID

www.SID.ir

هوازی گرمخانه گذاری شد تا شرایط برای رشد باکتری های نامطلوب سخت تر گردد. از پلیت‌های دارای بالاترین رقّت، کلنی‌هایی که از نظر شکل ظاهری، حاشیه‌ی کلنی، رنگ و سایر ویژگی‌های مورفولوژیکی متفاوت بودند، انتخاب شده و سپس هر کدام در پلیت جداگانه کشت خطی داده شدند و پس از چند بار کشت خطی کلنی‌های تک از هر جدایه به‌دست آمد. برای نگهداری جدایه ها به مدت طولانی، جدایه ها در MRS broth حاوی گلیسرول ۱۵٪ (V/V) دردمای -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۷]. تست‌های مرفولوژیکی شامل رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز، رشد در دمای مختلف ۱۰°C و ۴۵°C، زنده مانی در pH های ۴/۴ و ۹/۶در محیط کشت MRS broth ،آزمایش لوله دورهام جهت بررسی تولید گاز CO_2در این محیط و هم چنین رشد درغلظت نمک ۶/۵ درصد انجام پذیرفت. گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از ده نوع قند متفاوت (گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز، مانیتول و ملی‌بیوز) و با استفاده از محیط کشت فنل رد براث (کازئین پپتون+ سدیم کلرید+ فنل رد) (کیولب، کانادا) انجام پذیرفت [۸]. بعد از فعال سازی جدایه ها، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران) و مطابق دستورالعمل کیت انجام پذیرفت. از پرایمرهای عمومی زیر برای تکثیر ژن 16S rRNA استفاده گردید:

پرایمر پیشرو (Forward): GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG

پرایمر معکوس (Reverse): GAA AGG AGG TGA TCC AGC CG

میکروتیوب حاوی ۲۵ میکرولیتر از واکنش‌دهنده‌های PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر Sensquest (Germany)قرار داده و برنامه‌ی دمایی و تعداد سیکل‌های داده شده به دستگاه به این گونه بود: فعال سازی در دمای°C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل؛ واسرشته سازی: دمای °C ۹۴ به مدت ۳۰ ثانیه (دناتوراسیون)، اتصال پرایمر: دمای °C ۵۴ به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه: دمای °C ۷۲ به مدت ۲ دقیقه، ۳۳ سیکل؛ توسعه نهایی: دمای °C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل. جهت الکتروفورز از ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. پس از ارزیابی صحت انجام واکنش PCR توسط الکتروفورز و مشاهده‌ی باند در موقعیت ۱۵۰۰ جفت بازی محصولات واکنش PCR جهت تعیین توالی به صورت خوانش یک طرفه از پرایمر 27F، به شرکت Macrogen کره ارسال شدند. توالی‌های بدست آمده با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی (NCBI)، BLAST شده و مشابه‌ترین سویه به جدایه ی موردنظر تعیین گردید.

۲-۲- بررسی خواص ضد میکروبی

بیست جدایه از جنس و گونه‌هایی که در تخمیر آش کارده نقش داشتند انتخاب و آزمون‌های ذیل در ارتباط با آن‌ها انجام پذیرفت.

۲-۲-۱- روش نقطه گذاری

ابتدا جدایه های باکتری های اسید لاکتیک در محیط های کشت اختصاصی مایع با قندی برابر حداکثر ۰/۲ درصد گلوکز کشت داده شدند. پس از گذشت یک شب و قرار گرفتن باکتری ها در فاز لگاریتمی حدود ۵ میکرولیتر برداشته و روی سطح پلیت هایی با محیط کشت اختصاصی باکتری های اسید لاکتیک مانند BHI agar نقطه گذاری شدند و بعد از آن محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند. پس از گذشت زمان در نظر گرفته شده برای گرمخانه گذاری و رشد مناسب جدایه ها، سطح محیط های کشت توسط یک لایه آگار نرم که به میزان ۰/۲۵ درصد با میکروارگانیسم شاخص (جدول ۱) تلقیح شده، پوشانده شد. در ادامه پلیت‌ها تحت شرایط بهینه‌ی رشد میکروارگانیسم شاخص، گرمخانه گذاری گردیدند و در نهایت ۸ الی ۲۴ ساعت خواص ضد باکتریایی آنها مشاهده گردید [۹].

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱میکروارگانیسم های شاخص

شماره	میکروارگانیسم	شناسه
۱	*staphylococcus aureus*	ATCC 25923
۲	*Listeria inoccua*	ATCC 33090
۳	*Escherichia coli*	ATCC 25922
٤	*Salmonella typhi*	PTCC 1609
٥	*Bacillus cereus*	PTCC 1015
٦	*Bacillus subtilis*	PTCC 1720

۲-۲-۲- روش نفوذ در چاهک

در این روش باکتری هایی که در رو نقطه گذاری با ایجاد هاله روشن، خاصیت ضد باکتریایی نشان داده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. محیط های کشت مایع تلقیح شده به مدت ۱۰ دقیقه با RCF = ۸۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند. بعد از ایجاد چاهک، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت خنثی شده و استریل شده توسط فیلتر غشایی در BHI داخل این چاهک‌ها ریخته شد. پلیت ها به مدت ۸ ساعت قبل از گرمخانه گذاری جهت جذب کامل ماده بازدارنده، در دمای یخچال (٤ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. در ادامه پلیت ها تحت شرایط بهینه‌ی رشد میکروارگانیسم شاخص، گرمخانه گذاری گردیدند و در نهایت پس از ۸ الی ٢٤ ساعت با توجه به سرعت رشد میکروارگانیسم شاخص، خواص ضد باکتریایی آنها مشاهده شد؛ به این صورت که وجود هاله ی شفاف در اطراف چاهک ها نشان دهنده ی عدم رشد میکروارگانیزم شاخص بود [۹].

۲-۳- بررسی طبیعت ترکیبات ضد میکروبی

۲-۲-۳- تاثیر دماهای مختلف بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

جهت بررسی مقاومت ماده بازدارنده به گرما، مایع عاری از سلول باکتری هایی که در روش چاهک با ایجاد هاله روشن خاصیت ضدباکتریایی ناشی از مواد شبه باکتریوسین نشان دادند، در حرارت ۳۰ ، ٦٥ و ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و به ترتیب پس از ۹۰ ، ۳۰ و ۱۵ دقیقه خاصیت بازدارندگی آن ها در مقابل باکتری شاخص به روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت [۱۰].

۲-۲-٤- تاثیر سطوح مختلف pH بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

جهت بررسی اثر pH بر فعالیت مواد شبه باکتریوسینی با استفاده از HCl و NaOH استریل ۱ مولار، از مایع عاری از سلول باکتری مورد نظرمان در pH های ۳ تا ۱۱ تهیه شد. محیط کشت برین هارت اینفوژن مایع با pH تنظیم شده در محدوده مذکور به عنوان شاهد در این آزمایش استفاده شد. نمونه ها در دمای ٤ درجه سانتی گراد برای مدت ٢٤ ساعت نگهداری شدند. سپس فعالیت هر نمونه با روش چاهک مورد بررسی قرار گرفت [۱۱].

۲-۲-۵- تاثیر آنزیم پروتئیناز K بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

به منظور بررسی حساسیت آنزیمی ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، آنزیم پروتئیناز K به سوپرناتانت فاقد سلول با غلظت نهایی ۱ میلی گرم بر میلی لیتر افزوده شد. نمونه‌های شاهد شامل محیط استریل و آنزیم و محلول تیمار نشده‌ی سوپرناتانت عاری از سلول بودند. تمامی نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای ۱ ساعت گرمخانه گذاری شدند سپس آنزیم توسط حرارت در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد طی ۱۵ دقیقه غیرفعال شدند. خاصیت بازدارندگی پالوده کشت با روش نفوذ در چاهک نیز در برابر باکتری شاخص مورد بررسی قرار گرفت [۱۲].

Archive of SID

www.SID.ir

۲-٤- روش آماری

طرح آماری به کار رفته، طرح کاملا تصادفی با آزمون فاکتوریل بود. آزمایشات تماما در دو تکرار انجام پذیرفت. داده‌ها با استفاده از نرم افزارهای Excel و Minitab 17 آنالیز شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- جداسازی، طبقه بندی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

ابتدا ۲۲۵ ایزوله از نمونه‌های آش کارده جداسازی شد، که با کمک آزمون‌های گرم و کاتالاز این تعداد کاهش یافت. در مجموع ۱٤۰ جدایه از نمونه‌های آش کارده که شکل کلنی‌های آن‌ها با باکتری‌های اسید لاکتیک هم‌خوانی داشت، از نظر ویژگی-های بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به نتایج به دست آمده، جدایه‌ها متعلق به ۵ جنس لاکتوباسیلوس، ویسلا، انتروکوکوس، پدیوکوکوس و انتروکوکوس بودند. آن دسته از جدایه‌هایی که در زیر میکروسکوپ میله‌ای شکل بودند در گروه لاکتوباسیلوس طبقه‌بندی شدند. کوکو-باسیل‌های کوتاه گرم مثبت، کاتالاز منفی و هتروفرمنتاتیو که در دماهای ۱۰°C و٤۵°C قادر به رشد بودند، امّا در pH=۹/٦ رشد نکردند، به عنوان ویسلا شناسایی گردیدند. آن دسته از جدایه‌هایی که به صورت تتراد بودند به عنوان پدیوکوکوس، و همچنین جدایه‌های کوکسی و هتروفرمانتیو به عنوان جنس *لوکونوستوک* در نظر گرفته شدند. از بین جدایه‌های کوکسی شکل فقط یک جدایه‌قادر به تولید گاز بود که متعلق به جنس *لوکونوستوک* بود. جدایه‌های متعلق به جنس *انتروکوکوس*در pH= ۹/٦ رشد کردند، در حالیکه بقیه جدایه‌های کوکسی شکل رشدی از خود نشان ندادند. سپس با استفاده از آزمون تخمیر قند این ۱٤۰ جدایه به ۹ گروه طبقه‌بندی شدند (مبنای انتخاب و مقایسه‌ی قندها جلد سوم کتاب Bergey's Manual of Systematicبود). نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشمیایی، فیزیولوژیکی و تخمیر قند در جدول ۲، آورده شده است.

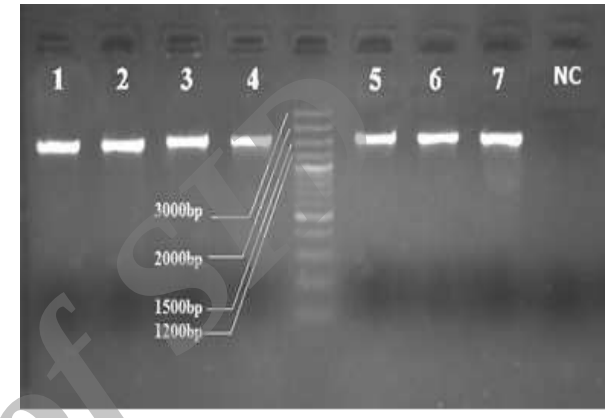
جدول ۲ نتایج مربوط به آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تخمیر قند مربوط به جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک ایزوله شده از آش کارده

شماره گروه	۱	۲	۳	٤	۵	٦	۷	۸	۹
تعداد جدایه‌ها	٤۲	٤۰	۲۱	۱۲	٦	٦	۳	٦	٤
رشد در ۱۰ °C	–	+	+	+	–	+	+	+	+
رشد در ٤۵ °C	+	–	–	+	۲*	–	–	+	+
رشد درpH=٤/٤	–	+	+	٤	+	۲	۱	+	+
رشد درpH=۹/٦	۳۱	۱۲	۱۳	–	–	–	–	+	+
رشد در غلظت ٦/۵ نمک	–	۳۱	۷	۹	+	۳	–	+	+
تولید گازCO_2از گلوکز	+	۱۰	+	+	–	+	+	–	–
گلوکز	+	+	+	۸	+	+	+	+	+
ساکارز	+	+	+	+	+	+	+	–	+
گالاکتوز	+	+	۲۰	+	+	+	–	+	+
فروکتوز	+	+	+	۳	+	+	۲	+	+
لاکتوز	+	+	+	+	٤	+	–	+	+
مالتوز	+	+	+	+	+	+	+	–	+
سوربیوتول	۳۵	+	+	+	–	+	–	–	–
رافینوز	+	+	–	+	–	–	–	–	–
مانیتول	۱۵	+	–	+	–	۵	۱	٤	+
ملی‌بیوز	+	۱۲	+	–	–	–	–	–	–

*تعداد جدایه هایی که به آزمون مربوطه جواب مثبت دادند

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به گروه‌بندی که توسط آزمایش‌های مبتنی بر کشت به دست آمد، از هر گروه چند جدایه انتخاب و مورد آزمون قرار گرفت. ابتدا DNAجدایه‌های مورد نظر استخراج شد. در مرحله‌ی بعد با کمک پرایمرهای عمومی تکثیر ژن 16S rRNA انجام گرفت. باندهای ایجاد شده از نظر اندازه در مکان ۱۵۰۰ جفت بازی بودند (شکل ۱).



شکل ۱ باندهای ۱۵۰۰bp حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA. NC: کنترل منفی

نتایج توالی‌یابی نشان داد که گونه غالب متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و گونه‌های *فرمنتوم* (۳۰/۰۰٪) و *پلانتاروم* (۵۷/۲۸٪) و *برویس* (۱۵/۰۰٪) می‌باشد. بقیه باکتری‌ها متعلق بودند به جنس‌های *ویسلا سیباریا* (۸/۵۷٪)، *انتروکوکوس فاسیوم* و *فکالیس* (۷/۱۴٪)، *لوکونوستوک سیتریئوم* و *مزنتروئیدوس* زیرگونه *مزنتروئیدوس* (۶/۴۲٪) و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* (۴/۲۸٪). محصولات تخمیری متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف دارای خصوصیات منحصربفردی هستند. فلور لاکتیکی به وسیله شرایط آب و هوایی خاص منطقه ای که در آن ماده غذایی تولید می‌شود، تحت تاثیر قرار می‌گیرد [۱۳]. در این مطالعه، ۵۸/۸۴٪ از جدایه‌ها توانایی رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد را دارا بودند. مقاومت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد بیانگر این مسئله است که چگونه آن‌ها با توجه به آب و هوای گرم استان خوزستان می‌توانند به عنوان فلور غالب در آش کارده شناخته شوند. وجود *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در غذاهای متعدد تخمیری گیاهی گزارش شده است. به علت استفده از گیاه کارده در فرمولاسیون این غذای تخمیری انتظار وجود این گونه در بین اعضای فلور لاکتیکی آش کارده وجود داشت (۱۴ و ۱۵). سویه‌های جنس ویسلا نیز به طور گسترده‌ای در طبیعت پراکنده هستند. ویسلا اولین جنس از خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک می‌باشد که می‌تواند در هر دو گروه کروی و میله‌ای طبقه‌بندی گردد. *ویسلا سیباریا*در غذاهای تخمیری بسیاری (کاساوا[۲]،خمیر ترش و نوشیدنی ژاپنی الکی شوچو[۳]) یافت شده است [۱۸- ۱۶]. ویسلا و لوکونوستوک در مراحل ابتدایی تخمیر حضور دارند و می‌توانند در فرایند تولید اسید نقش داشته باشند. توانایی رقابت بسیار کم اعضای جنس لوکونوستوک با سایر باکتری‌های اسید لاکتیک و همچنین عدم توانایی رشد در pHهای پایین از جمله دلایل درصد پایین حضور این جنس در مواد غذایی تخمیری سنتی می‌باشد[۱۹]. مقاومت بالای انتروکوکوسی‌ها نسبت به دمای بالا توجیه کننده حضور این جنس در آش کارده می‌باشد. تا مدت زمان بسیار طولانی حضور جنس انتروکوکوس در مواد غذایی به عنوان عدم ایجاد شرایط بهداشتی مناسب در طول فرایند آماده سازی و تولید محصول در نظر گرفته می‌شد. اما امروزه حضور گونه‌هایی مانند *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم* در محصولات غذایی صرفا به عنوان آلودگی در نظر گرفته نمی‌شوند. بنابراین انتروکوکسی‌ها می‌توانند به عنوان بخش طبیعی از فلور میکروبی یک ماده غذایی در نظر گرفته شوند [۱]. آرایش تتراد به عنوان یک نکته مهم در شناسایی جنس پدیوکوکوس نقش دارد. *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*در بسیاری از تخمیرهای گیاهی نقش دارد و در تخمیر آش کارده نیز حضور داشت، که می‌توان آن را به تحمّل غلظت زیاد نمک و قدرت تطبیق بالای این سویه با شرایط اسیدی نسبت داد [۲۰]. در این پژوهش، از روش‌های مبتنی بر کشت و همچنین روش آنالیز ژن16S rRNA برای شناسایی فلور لاکتیکی آش کارده استفاده شد. هر روش مزایا و معایب خاص خود را داراست.

2. Cassava
3. Shochu

Archive of SID
www.SID.ir

روش‌های شناسایی سنتی مبتنی بـر خـصوصیات مورفولـوژیکی، فیزیولوژیکی، تست‌های بیوشـیمیایی و تخمیـر کربوهیـدرات‌هـا وقت‌گیر و نه چندان دقیق و موثق می‌باشند. همینطور، توالی‌یـابی ژنrRNA 16S روش سریع و قابل اعتمادی می‌باشـد اگـر چـه ممکن است نتایج حاصل از این روش گیج کننده باشند که علـت آن، اطلاعات وسـیع مـرتبط بـا تـوالی‌هـای ژنـی در بانـک‌هـای اطلاعاتی می‌باشد. بنابراین، استفاده از روش‌های پلی‌فازیک برای شناسایی هر سویه ضروری به نظر می‌رسد.

۳-۲- بررسی خواص ضد باکتریایی جدایه‌هـای آش کارده

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌گر این موضوع می‌باشد که در آزمون نقطه گذاری از میان ۲۰ سویه مورد آزمون قرار گرفته، ۱٦ سویه حداقل بر یکی از باکتری‌های شاخص موثر بوده است (جدول ۳). به عبارتی دیگر، باکتری*S. aureus* توسط ٦جدایه، باکتری *E. coli* توسط ۹ جدایه، باکتری *L. inoccua*توسط ۷ جدایه، باکتری *S. typhi*توسط ٤ جدایه، باکتری *B. cereus* توسط ۷ جدایه و باکتری *B. subtilis*توسط ۳ جدایه ممانعت گردیدند.همانگونه که از نتایج مشخص است در بین باکتری‌های شاخص بیماریزا، باکتری *E.coli* بیشتر از بقیه تحت تاثیر قرار گرفته است.دو جدایه *Ent. Faecium* و *Lb. Plantarum* بیشترین اثر بازدارنگی را بر روی باکتری *L. inoccua* نشان دادند. طیف بازدارندگی وسیعی که باکتری های بیماری‌زا و عامل فساد ناشی از مواد غذایی را در بر می گیرد، اشاره به عمومی بودن خاصیت بازدارندگی که جزئی از عوامل وابسته به کلنی[4] می باشد، دارد. این مواد بازدارنده به غیر از از باکتریوسین یا ترکیبات شبه باکتریوسین می‌توانند تولید اسید و یا هیدروژن پراکسید را در بر گیرند [۲۱].

باکتری‌های جنس انتروکوکوس توانایی زیادی در تولید ترکیباتی با فعالیت ضدمیکروبی بالا را دارا می‌باشند. بسیاری از این باکتری‌ها گروه ناهمگن و متفاوتی از پپتید های ضد میکروبی که نوعی باکتریوسین است تولید می کنند که عموما به این مواد انتروسین اطلاق می شود. انتروسین ها دارای طیف متفاوتی از فعالیت بازدارندگی، ساختار و مکانیسم تولید و ترشح می باشند. در اصل، انتروسین ها پپتید هایی کوچک، آبگریز، مقاوم به حرارت و دارای پتانسیل تکنولوژیکی جالب هستند. فعالیت انتروسین در مقابل *Listeria monocytogenes* و برخی انتروکوکسی های تولید کننده ی باکتریوسین مورد ارزیابی قرار گرفته و امروزه از آن به عنوان یک نگهدارنده طبیعی در فرآورده های تخمیری، لبنی و گوشتی استفاده شود. کاهش pHدر مواد غذایی تخمیری که به وسیله باکتری‌های اسید لاکتیک انجام می-پذیرد، یک عامل مهم و اساسی در ایمنی مواد غذایی محسوب می‌شود. از اینرو، این عامل می تواند منجر به حذف باکتری‌های ناخواسته و حتی پاتوژن‌ها شود. این موضوع از آنجایی حائز اهمیت شده است که باکتری‌های اسیدلاکتیک در زیستگاه‌هایی با ویژگی‌های مطلوب همانند بالا بودن فعالیت آبی (aw) و مغذی بودن قادر به بقا می‌باشند، این چنین محیطی برای تکثیر سایر باکتری‌ها نیز مطلوب می‌باشد. به هر حال، توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در مهار گونه‌ها به طور موثر تنها ناشی از توانایی آنها برای کاهش pH نمی‌باشد بلکه به طبیعت اسیدهای آلی که آنها تولید می‌نمایند نیز بستگی دارد.

همچنین، دیگر مواد ضدمیکروبی مانند متابولیت‌های اکسیژن زا (به عنوان مثال هیدروژن پراکسید)، باکتریوسین ها، دی استیل، استالدهید و ایزومرهای اسید های آمینه می‌توانند باعث افزایش فعالیت بازدارندگی باکتری‌های اسید لاکتیک گردند [۲۲].

4. Colony- associated metabolic compounds

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ قطر هاله بازدارندگی حاصل از آزمون Agar spot

شماره	نام باکتری	*S. aureus*	*E. coli*	*L. inoccua*	*S. typhi*	*B. cereus*	*B. subtilis*
۱	*Ent. faecium*	+*	–	+++	+	–	–
۲	*Lb. fermentum*	+	+	–	–	+	+
۳	*Ent. faecium*	–	+	–	–	–	–
٤	*Lb. plantarum*	+	+	++++	++	+	–
٥	*Ent. faecalis*	–	–	–	–	–	–
٦	*P. pentosaceus*	–	+	+	+	–	–
۷	*Ent. faecium*	–	+	–	–	+	+
۸	*Lb. fermentum*	+	–	–	–	–	–
۹	*Lb. brevis*	–	–	+	–	–	–
۱۰	*Ent. faecalis*	–	–	–	–	+	–
۱۱	*P. pentosaceus*	+	–	+	++	+	+
۱۲	*Lb. fermentum*	+	+	–	–	+	–
۱۳	*Lb. plantarum*	–	–	+	–	++	–
۱٤	*Ent. faecalis*	–	+	–	–	–	–
۱٥	*P. pentosaceus*	–	+	–	–	–	–
۱٦	*Ent. faecium*	–	+	+	–	–	–

*تعداد علامت‌های مثبت بیانگر قطر هاله بزرگتر و در نتیجه مبین قطر هاله بزرگتر می‌باشد. علامت منفی: عدم ایجاد هاله شفاف

از جدایه‌هایی که بر هیچ یک از باکتری‌های شاخص تاثیر بازدارندگی نداشتند در جدول فوق آورده نشده اند

همانگونه که ذکر شد ایجاد هاله شفاف بازدارندگی ممکن است به دلایلی بغیر از تولید باکتریوسین مربوط باشد بنابراین با استناد به نتایج حاصل از آزمون نقطه گذاری نمی‌توان به طور قطعی و نهایی اظهار نظر نمود. لذا تمام جدایه‌هایی که با روش قبل نتیجه مثبت از خود نشان دادند، در قالب آزمون چاهک مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون عصاره فاقد سلول باکتری‌ها از نظر تولید هاله شفاف مورد آزمون قرار گرفتند. جدول ٤ نتایج حاصل از آزمون چاهک را برای۱٦ جدایه باکتری اسید لاکتیک نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٤ قطر هاله بازدارندگی حاصل از آزمون نفوذ در چاهک

شماره	نام باکتری	*S. aureus*	*E. coli*	*L. inoccua*	*S. typhi*	*B. cereus*	*B. subtilis*
۱	*Ent. faecium*	–	–	+	–	–	–
۲	*P. pentosaceus*	+	–	–	+	–	–
۳	*Ent. faecium*	–	+w*	–	+	+w	–
٤	*Lb. plantarum*	–	–	++	–	–	+
٥	*Ent. faecalis*	–	–	+++	–	–	–
٦	*P. pentosaceus*	–	+w	–	–	+	–
۷	*Ent. faecium*	+	–	–	–	+	–
۸	*Lb. fermentum*	–	+	–	–	–	+
۹	*Lb. brevis*	–	+	–	+w	–	–
۱۰	*Ent. faecalis*	–	–	–	–	–	+
۱۱	*P. pentosaceus*	–	+	++	–	–	–
۱۲	*Lb. fermentum*	–	+w	–	–	–	–
۱۳	*Lb. plantarum*	–	+	+++	–	+w	+w
۱٤	*Ent. faecalis*	–	+w	–	–	–	–

*w=weak : تشکیل هاله شفاف به صورت ضعیف و کم

تعداد علامت‌های مثبت بیانگر قطر هاله بزرگتر و در نتیجه مبین قطر هاله بزرگتر می‌باشد. علامت منفی: عدم ایجاد هاله شفاف

با توجه به جدول ٤، در میان باکتری‌های شاخص بیماری‌زا باکتری *E. coli* توسط بیشترین تعداد جدایه باکتری اسید لاکتیک (۸ جدایه) و *S. aureus* توسط کمترین تعداد جدایه‌ها (۲ جدایه) ممانعت شدند. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) به نتایج مشابهی دست یافتند. مطالعه آن‌ها بر روی جدایه‌های حاصل از پنیر کردی نشان داد که هیچ یک از جدایه‌های انتروکوکوس نتوانستند بر روی باکتری شاخص *S. aureus* اثر ممانعتی ایجاد کنند.اثر بازدارندگی بر روی باکتری *E. coli*ضعیف بود و بالاترین اثر ممانعت کنندگی بر روی لیستریا مشاهده شد [۹]. خای و همکاران (۲۰۱۱) جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک را از نوعی شیر تخمیری جداسازی نمودند و سپس فعالیت ضد میکروبی آن‌ها را بر روی سویه‌های شاخص بیماری‌زا بررسی کردند. نتایج تحقیقاتشان نشان داد جدایه‌های انتروکوکوس مخصوصا *انتروکوکوس فاسیوم*،که در محصولات غذایی زیادی وجود دارند و ویژگی های مثبت تکنولوژیکی و پروبیوتیکی آن‌ها شناخته شده است، کاندیداهای خوبی برای فعالیت علیه *لیستریا مونوسیتوژنز* موجود در غذاها می‌باشند [۲۳]. باکتری‌های اسید لاکتیک عموما در برابر باکتری‌های گرم منفی فعالیت کمتری از خود بروز می‌دهند که علت آن ساختار غشای خارجی این دسته از باکتری‌هاست. هر چند مطالعات اخیر و اثر نیسین و سایر باکتریوسین‌ها بر روی باکتری‌های گرم منفی موجب افزایش توجهات به این مسئله شده است [۲۳ و ۲٤]. همانگونه که مشاهده می گردد نتایج حاصل از نفوذ در چاهک با نتایج حاصل از نقطه گذاری متفاوت است. علت آن است که در روش نقطه گذاری به غیر از ترکیبات بازدارنده پروتئینی یا همان باکتریوسین-ها یا ترکیبات شبه باکتریوسینی، ترکیبات دیگری از جمله اسیدهای آلی، پر اکسید هیدروژن و اسید های چرب نیز می‌توانند باعث بروز خاصیت ضد میکروبی شوند.

در مرحله بعد و برای بررسی تاثیر درجه حرارت، pH و آنزیم پروتئاز بر روی خاصیت ضد میکروبی و بازدارندگی سوپرناتانت فاقد سلول، فقط آن دسته از جدایه‌هایی انتخاب شدند که بر روی باکتری شاخص *لیستریا اینوکوآ* موثر بوده و هاله شفاف بازدارندگی تولید کرده بودند.

۳-٤- بررسی طبیعت ترکیبات ضد میکروبی

نتایج حاصل از تاثیر دماهای مختلف (۳۰C° به مدت ۹۰ دقیقه، ٦٥C° به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰ C° به مدت ۱۵ دقیقه و دمای

Archive of SID

www.SID.ir

°C۱۲۱ به مدت ۱۵ دقیقه) بر خاصیت بازدارندگی مواد شبه باکتریوسین سویه های بازدارنده در جدول ٤ نشان داده شده است. پنج جدایه ای که در جدول شماره ٤ تاثیرات ضد باکتریایی آن‌ها علیه لیستریا اثبات شده بود در این بخش مورد آزمون قرار گرفتند.

جدول ۵ تاثیر تیمارهای دمایی مختلف بر خاصیت بازدارندگی مواد ضد میکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول (اندازه‌گیری بر حسب میلی متر)

شماره	عامل		Indicator bacteria: *Listeriainoccua*					
	حرارت (C°)	زمان (دقیقه)	*Ent.faecium*	*Lb. plantarum*	*Ent. faecalis*	*P. pentosaceus*	*Lb. plantarum*
۱	۳۰	۹۰	۹/۰۸±۰/۲۳	۸/۷۹±۰/۲۹	۸/۹۰±۰/۲۸	۸/۵۱±۰/۵۱	۷/۹٤±۰/۵۱
۲	٦۵	۳۰	۸/۱٦±۰/۳٦	۷/۸۹±۰/٤٦	۷/۸۰±۰/٤۹	۷/۵٦±۰/٤۸	۷/۵٤±۰/۳٤
۳	۱۰۰	۱۵	۵/۰٤±۰/٤۱	٤/۸۵±۰/٤۹	۵/۰۲±۰/۳۸	٤/۷۱±۰/۲٦	۵/۰۱±۰/۲۵
٤	۱۲۱	۱۵	٤/۹٦±۰/۳۷	٤/۷٦±۰/۳٦	٤/٦۷±۰/٤۵	٤/۷۵±۰/۲۸	٤/٤۷±۰/۳۹
۵	نمونه شاهد*		۱۰/۱۸±۰/٤۹	۹/۵۸±۰/۳۷	۹/٦٦±۰/۳٦	۸/۹۱±۰/٤۳	۸/۵۷±۰/۵۳

اعداد میانگین دو تکرار به همراه انحراف معیار آن‌ها هستند

*سوپرناتانتی که هیچ تیمار حرارتی بر روی آن اعمال نشده است

نتایج نشان دهنده این موضوع هستند که با افزایش تیمار حرارتی قطر هاله بازدارندگی کاهش پیدا می‌کند. مقایسه اعداد مربوط به هاله بازدارندگی در تمامی دماها نسبت به نمونه شاهد عدد کمتری را نشان می‌دهد. که این موضوع مشخص کننده این حقیقت است که ترکیبات بازدارنده حساس به حرارت می‌باشد (جدول ۵). با توجه به فرمول $\Delta d = d_{control} - d_{121\,c}$ (اختلاف قطر هاله در حالت شاهد با قطر هاله در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد) جدایه *انتروکوکوس فاسیوم* دارای سوپرناتانتی با بیشترین حساسیت یا کمترین مقاومت و جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان مقاومت‌ترین سوپرناتانت در برابر حرارت شناخته شدند. به طور کلی اکثر باکتریوسین‌ها یا ترکیبات شبه باکتریوسینی به علت ماهیت پپتیدی و همچنین وزن مولکولی پایینی که دارند، با افزایش دما شاهد روند کاهشی در فعالیت ضد میکروبی آن‌ها خواهیم بود [۲۵].

جهت بررسی فعالیت ترکیبات باکتریوسینی یا شبه باکتریوسینی در مقابل سطوح مختلف pH، مقاومت عصاره فاقد سلول در pHهای مختلف ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در جدول ٦ مشخص شده است.

جدول ٦ بررسی سطوح مختلف pH بر ترکیبات دارای فعالیت ضد میکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول جدایه‌ها بر حسب قطر ممانعت کننده از رشد (میلی متر)

شماره	نام باکتری	Indicator bacteria: *Listeriainoccua*									
		pH=3		pH=5		pH=7		pH=9		pH=11	
		شاهد*	CFS*	شاهد	CFS	شاهد	CFS	شاهد	CFS	شاهد	CFS
۱	*Ent.faecium*	۸/۰۲±۰/۲٤	۱۳/۰٦±۰/۱۹	٦/٤۹±۰/۲۹	۱۰/۹۷±۰/۳۱	۰	٦/٤۸±۰/٦۵	۰	۰	۰	۰
۲	*Lb. plantarum*	۸/۵۷±۰/۳۱	۱۲/٤۵±۰/٦۳	۵/۹۲±۰/۲۵	۹/۵۸±۰/۳۸	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳	*Ent. faecalis*	۹/۱۵±۰/۲۰	۱۱/۹٤±۰/۲٦	۷/۲۲±۰/۲۸	۸/۷۹±۰/۲۷	۰	۵/۵۰±۰/٤۲	۰	۰	۰	۰
٤	*P. pentosaceus*	۸/٤٦±۰/٤۰	۱۲/۹۰±۰/۲۸	٤/۹۹±۰/۳۲	۱۰/۰۱±۰/٤۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۵	*Lb. plantarum*	۸/۰۱±۰/۲۱	۱۱/۷۰±۰/٤۰	۵/۵۳±۰/۲۷	۹/۸۰±۰/۲٦	۰	۰	۰	۰	۰	۰

اعداد میانگین دو تکرار به همراه انحراف معیار آن‌ها هستند

*سوپرناتانتی که هیچ تیمار حرارتی بر روی آن اعمال نشده است

*سوپرناتانت عاری از سلول

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج به دست آمده بیانگر این موضوع است که که بیشترین فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت عاری از سلول جدایه‌های آش کارده مربوط به pH=3 می‌باشد و هر چقدر به سمت pH های خنثی و قلیایی حرکت کنیم از میزان فعالیت ممانعت کنندگی آن ها کم می‌شود. دلیل فعالیت بالاتر ضد میکروبی در pH اسیدی مربوط به اسیدیته ناشی از تولید اسید لاکتیک می‌باشد. تاگ و همکاران، بیان داشتند باکتریوسین ها از لحاظ حساسیت نسبت به pH به صورت قابل ملاحظه ای با یکدیگر اختلاف دارند [۲۶]. عبدالباسط و جمیلا (۲۰۰۸) فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نوعی شیر تخمیری متعلق به الجزایر را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد فعالیت ضد میکروبی ترکیبات از pH ۳ تا ۱۰ فعال هستند اما بیشترین فعالیت در تحت شرایط اسیدی بوده و با افزایش قلیاییت فعالیت آنتاگونستی کاهش یافته است [۲۷]. نتایج حاصل از بررسی اثر آنزیم پروتئیناز K بر روی خاصیت ضد میکروبی سوپرناتانت جدایه‌ها نشان دهنده این موضوع بود که بجز یک مورد (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)، هاله بازدارندگی مربوط به بقیه جدایه-ها صفر شده بودند. این نتایج مبین این موضوع می‌باشد که ترکیبات ضد میکروبی مورد آزمون قرار گرفته ماهیت پروتئینی دارند چرا که تحت تاثیر یک آنزیم پروتئولیتیک قرار گرفته اند [۲۸].

٤- نتیجه‌گیری

در این پژهش برای اولین بار ۱٤۰ سویه باکتری اسید لاکتیک از آش کارده جداسازی و با استفاده از توالی‌یابی ژن 16S rRNA تعیین هویت گردید. فلور غالب به جنس *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* تعلق داشت. مطالعه بر روی تنوع جمعیتی و میکروبی غذاهای سنتی از جهت افزایش اطلاعات در مورد طبیعت سویه‌های موجود و نگهداری آن‌ها در قالب بانک میکروبی بومی بسیار قابل اهمیت می‌باشد. ویژگی‌های ضد میکروبی بعضی از جدایه‌های اسید لاکتیک در این تحقیق با استفاده از روش‌های نقطه گذاری و نفوذ در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. سپس ویژگی‌های ذاتی ماده باکتریوسینی یا شبه باکتریوسینی با استفاده از آزمون‌های مقاومت به حرارت، pH و آنزیم پروتئیناز K بر روی سوپرناتانت فاقد سلول ۵ جدایه و بر روی باکتری شاخص *لیستریا اینوکوآ* مورد ارزیابی قرار گرفت. غذاهایی که در فرمولاسیون آنها از نگهدارنده های شیمیایی استفاده شده، نگرانی مصرف کنندگان را بر می انگیزد و این نیاز را در صنعت ایجاد می کند که در جهت تولید غذاهای طبیعی و یا کمتر فرآوری شده حرکت نماید. در نتیجه امروزه تمام توجهات به استفاده از مواد ضد میکروبی طبیعی جلب شده است. به همین دلیل استفاده از مواد ضد میکروبی پپتیدی حاصل از باکتری های اسید لاکتیک(LAB) مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به نتایج به دست می توان از این قابلیت ضد مکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک یا سوپرناتانت آن‌ها به عنوان نگهدارنده طبیعی بهره برد.

٥- تقدیر و تشکر

مقاله علمی ـ پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۳۲۲۱۵ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelmem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J and De Vuyst, L. (2006). "Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products." Systematic and applied microbiology 29(6): 487-495.

[2] Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Ghaitaranpour A, Jouki M. 2012. Isolation, identification and comparison of lactic acid bacteria from fermented be produced in Iran Kimchi with Korean commercial samples: introduction of a probiotic product. Scientific Journal of Biological Sciences. 1(6): 120-125.

[3] Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S., Thepkasikul, P., 2004. Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nhamcharacteristics. Meat Science 66, 579–588.

Archive of SID
www.SID.ir

[4] Chakrabarti P, Das B K and Kapil A (2009) Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. Indian Journal of Medical Research 129 (2) 182.

[5] De Vuyst, L. and Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 13 (4), 194-199.

[6] Riley, M. A., Chavan. M. A. 2007. Bacteriocins, Ecology and Evolution, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:53-81.

[7] Sengun, I.Y., Nielsen, D.S., Karapinar, M., Jakobsen, M., 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. International Journal of Food Microbiology 135(2), 105-111.

[8] Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology 65, 3418 - 3426.

[9] Edalatian, M. R., HabibiNajafi, M. B., Mortazavi, S. A., Alegría, A., Delgado, S., Bassami, M. R., Mayo, B. 2012. Production of bacteriocinsby Enterococcus spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. Eur Food Res Technol , 234:789–796.

[10] Cardoso, M. D. L. M., Manzo, R. M., Tonarelli, G. G., andSionetta, A. C. 2012. Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of Enterococcus faecalis DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. International Journal of Dairy Technology, 65(4), pp:568-577.

[11] Lou, F., Feng, S.,Qun, S., Xiang, W., Zhao, J., Zhang, J., and Yang, Z. 2011. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. Food Control, 22, pp: 50-53.

[12] Ghrairi, T., Frère, J., Berjeaud, J.M. and Manai, M., 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by Lactococcuslactis isolated from rigouta cheese. International Journal of Food Microbiology, 105(3):389-398.

[13] KURMANN, J.A. 1984. The production of fermented milk in the world: aspects of the production of fermented milks. International Dairy Federation Bulletin. 179, 16–26.

[14] McDonald, L.C., Fleming, H.P., Hassan, H.M., 1990. Acid tolerance of Leuconostocmesenteroides and Lactobacillus plantarum. Applied and Environmental Microbiology 56, 2120 2124.

[15] MOLIN, G. 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to Lactobacillus plantarum 299v1–3. American Society for Clinical Nutrition. 73 (2), 380–385.

[16] Bjorkroth, K. J., Schillinger, U., Geisen, R.,Weiss, N., Hoste, B., Holzapfel,W.H.,Korkeala, H., and Vandamme, P., 2002. Taxonomic study of Weissellaconfusaanddescription of Weissellacibaria sp. nov., detected in food and clinical samples.International Journal ofSystematic and Evolutionary Microbiology, 52(1):141-148.

[17] De Vuyst, L., Schrijvers, V., Paramithiotis, S., Hoste, B., Vancanneyt,M., Swings, J., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., and Messens,W., 2002. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. Applied and Environmental Microbiology, 68: 6059-6069.

[18] Kostinek, M., Specht, I., Edward,V. A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel,W.H., and Franz, C.M., 2005. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. Systematic and Applied Microbiology, 28: 527-540.

[19] Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L.-H., Hsiao, K.-N., Chen, Y.-S., 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocinfrom Weissella cibaria110, isolated fromplaa-som,afermentedfish product from Thailand. Applied and Environmental Microbiology 7, 2247–2250.

[20] Daeschel, M. A., Anderson, R. E., and Fleming, H. P. 1987.Microbial ecology of

Archive of SID

www.SID.ir

fermenting plant material. Federation of European Microbiological Societies, 46: 357-367.

[21] Alegría, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology, 136: 44-51.

[22] Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation . International Journal of Food Microbiology, 71(1): 1-20.

[23] Khay, E. O.,Idamor, M., Pastrana Castro, L, m., Bernárdez, p, f., Senhaji, N, S. and Abrini, J. (2013). "Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk." African Journal of Biotechnology 10(51): 10447-10455.

[24] Helander IM, Von Wright A, Mattila-Sandholm TM (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. Trends. Food. Sci. Technol. 8(5): 146-150.

[25] Martı´n-Platero A M, Valdivia E, Ruı´z-Rodrı´guez M, Soler J J, Martı´n- Vivaldi M, Maqueda M and Martı´nez-Bueno M. 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by Enterococcus faecalis MRR 10-3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (Upupaepops). Applied and Environmental Microbiology 72 4245–4249.

[26] Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW (1976). Bacteriocins ofGrampositive bacteria. Bacteriol Rev. 40: 722-756.

[27] Abdelbasset, M. and K. Djamila (2008). "Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb"." African Journal of Biotechnology7(16).

[28] Bromberg R, Moreno I, Zaganini CL, Delboni RR, de Oliveira J (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. Braz. J. Microbiol. 35: 137-144.

Archive of SID

www.SID.ir

Diversity of Lactic Acid Bacteria communities in “Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds

Tabatabaei Yazdi, F. [1*], Vasiee, A. R. [2], Alizadeh Behbahani, B. [2], Mortazavi, S. A. [3], Tabatabaei Yazdi, F.[4]

1. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Ph.D Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Prof, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
4. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 93/12/8 Accepted: 94/2/8)

The aim of this work was identified lactic floraas a traditional fermented food and then evaluates antimicrobial activities of some strains. A total of 140 Gram-positive and catalase-negative isolates were subjected to grouping by physiological and biochemical tests and carbohydrates fermentation. Based on the resultsthese 140 isolateswere dividedinto 9 groups. Two or three isolated were selected from each group and 16S rRNA was amplified using universal primers. Diversity of lactic acid bacteria in horreh was as followings:*Lactobacillus fermentum* (30.00%),*Lactobacillus plantarum* (28.57%), *Lactobacillus brevis* (15.00%), *Weissellacibaria*(8.57%),*Enterococcus* (*faecium* and *faecalis)* (7.14 %), *Leuconostoc* (*citreum*and *mesenteroides* subsp.*Mesenteroides*) (6.42%) and *Pediococcus pentosaceus* (4.28%). Antagonistic activity of 20 isolates (strains) of lactic acid bacteriaobtained fromhorreh was evaluated against food- borne bacteria. Sixteen isolates in Agar spot method and 14 isolates in well diffusion assayshowed antibacterial activity against at least one of these indicators. Eight isolates including:*Ent. faecium* (1), *Ent. faecalis* (1), *P. pentosaceus*(1) and *Lb. plantarum* (2) exhibited the highest antagonistic activity toward *Listeria innocoa.* Antagonistic activity of cell free supernatant (CFS) from *Lb. plantarum* showed the highest thermal stability. Also, two isolates belonging to:*Ent. faecium, Ent. Faecalis* presented antibacterial activity at pH=7. Only, the supernatant of *Lb. plantarum* was not influenced by proteinase K.The results showed that the supernatant of some isolatestestedcan be used as a bio preservative in food products.

Keywords: Ash kardeh, Lactic acid bacteria, 16s rRNA, Antagonistic activity, Bacteriocin,

[*]Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir