مجله میکروب شناسی مواد غذائی

JFM

رابطه فیلوژنتیکی و خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو

مریم ابراهیمی[1]، علیرضا صادقی[2]*، بلال صادقی[3]

۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

نویسنده مسئول*: *sadeghi.gau@gmail.com*

تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش : ۱۳۹۶/۰۴/۰۱

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی خواص پروبیوتیکی و رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو بود. ابتدا باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده به کمک PCR دارای پرایمر اختصاصی شناسایی گردیدند. سپس ویژگی‌های پروبیوتیکی آنها شامل زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، اثر آنتاگونیستی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژنز*، *اشرشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* به عنوان شاخص‌های باکتریایی غذازاد، قابلیت تجمعی در برابر *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* به عنوان عوامل عفونی روده و همچنین مقاومت این جدایه‌ها در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین رابطه قرابتی جدایه‌های لاکتیکی نیز از ترسیم درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش بیشترین درست‌نمایی استفاده شد. توالی‌یابی محصولات PCR، منجر به شناسایی *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس کوریا*، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *ویسلا سیباریا* به عنوان باکتری‌های اسید لاکتیک غالب خمیرترش آرد کامل جو شد. *لاکتوباسیلوس برویس* در مقایسه با جدایه‌های لاکتیکی دیگر به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از زنده‌مانی بیشتری در pH=۲ و نمک صفراوی ۰/۳٪ برخوردار بود. بیشترین قطر هاله عدم رشد هر چهار شاخص باکتریایی نیز تحت تاثیر *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* ایجاد شد. همچنین قابلیت تجمعی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* از سه جدایه لاکتیکی دیگر به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بود و هر چهار جدایه لاکتیکی در برابر ونکومایسن از خود مقاومت نشان دادند. آنالیز درخت فلیوژنتیکی توالی‌های همردیف شده نیز نشان داد که *لاکتوباسیلوس کوریا* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دارای قرابت فیلوژنتیکی بسیار زیادی به یکدیگر بودند در حالی که بیشترین فاصله ژنتیکی نیز بین *لاکتوباسیلوس برویس* و *ویسلا سیباریا* مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: خواص پروبیوتیکی، رابطه فیلوژنتیکی، خمیرترش آرد جو، جدایه لاکتیکی.

مقدمه

باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB[1]) که فلور میکروبی غالب بسیاری از فرآورده‌های تخمیری را به خود اختصاص می‌دهند در گروه ارگانیسم‌های کاملا ایمن (GRAS[2]) قرار می‌گیرند. این باکتری‌ها، میله‌ای یا کروی شکل، گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیر متحرک، بی‌هوازی یا میکروآیروفیل و غیر اسپورزا بوده و محصول اصلی تخمیر کربوهیدرات‌ها توسط آنها اسید لاکتیک است (Patil et al., 2010; Gaspar et al., 2013). بسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیک خصوصا برخی از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* دارای قابلیت‌های پروبیوتیکی هستند (Salminen et al., 2004; Cabellero et al., 2016). پروبیوتیک اصطلاحاً به کشت میکروبی زنده و فعالی اطلاق می‌شود که ضمن بقاء و تجمع

1. Lactic Acid Bacteria
2.Generally Recognized as Safe

در دستگاه گوارش، دارای اثرات فیزیولوژیکی مثبتی بر مصرف کننده باشد. پروبیوتیک‌ها از ویژگی‌های متعددی همچون خاصیت ضد میکروبی، مقاومت به اسید معده و املاح صفراوی، اتصال به سطوح مخاطی و اتصال به باکتری-های بیماری‌زا و همچنین توانایی تشکیل کلنی در روده یا واژن برخوردارند. این میکروارگانیسم‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های سنتزی در پیشگیری و درمان عوارض بسیاری از عوامل عفونی و بیماری‌زای دستگاه گوارش نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند (Saarela et al., 2000; Saad et al., 2013). خمیرترش محصول تخمیر غیر اسپتیک آب و آرد غلات است که یکی از بهترین منابع شناخته شده برای باکتری‌های اسید لاکتیک دارای ویژگی-های پروبیوتیکی به شمار می‌آید (Poutanen et al., 2009; Manini et al., 2016). در اکثر انواع خمیرترش، یک گستره ویژه از باکتری‌های اسید لاکتیک، غالب می‌شوند که در ویژگی‌های خمیرترش تولیدی نظیر خاصیت ضد کپکی و ضد بیاتی آن به شدت موثر هستند (Corsetti and Settanni, 2007). بررسی‌های انجام شده توسط محققین مختلف در راستای جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات تخمیری غلاته و استفاده از آنها جهت تولید فرآورده‌های غذایی سلامتی‌بخش، نشانگر اهمیت این باکتری‌ها در ایمنی و سلامت مصرف کننده می-باشد. تودوروو و همکاران (۲۰۰۸) ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بوزا (نوشیدنی تخمیری مبتنی بر غلات) را مورد مطالعه قرار دادند. تمامی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از بوزا توانستند در pH=۳ و در حضور ۰/۳٪ نمک صفراوی زنده مانده و به واسطه تولید ترکیبات باکتریوسینی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند. در این بین، درصد زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش به شکل محرزی از سایر جدایه‌ها بیشتر بود. باکتری مذکور به دلیل خاصیت آبگریزی بالای دیواره سلولی از قابلیت آنتاگونیستی و اتصال مناسبی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا نیز برخوردار بود (Todorov et al., 2008). پاتیل و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که جدایه‌های لاکتیکی پروبیوتیک به واسطه تولید متابولیت‌های ضد میکروبی مختلف مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، پپتیدهای زیست فعال و اگزوپلی‌ساکاریدها از قابلیت مهار میکروارگانیسم‌های عامل فساد و بیماری‌زای غذازاد برخوردارند. تولید این ترکیبات ضد میکروبی بر افزایش زمان ماندگاری و ایمنی میکروبی فرآورده‌های غذایی نیز موثر است (Patil et al., 2010). لی و همکاران (۲۰۱۳) نیز به بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه‌های مختلف *ویسلا سیباریا* و *ویسلا کونفوسا* پرداختند. در این پژوهش، تمام سویه‌های *ویسلا سیباریا* در pH=۲ از بین رفتند اما در pH=۳ دارای مقادیر زنده‌مانی اندکی بودند. همچنین میزان زنده‌مانی *ویسلا کونفوسا* در pH=۲ و نمک صفراوی ۰/۳٪ به ترتیب ۲۰/۲ و ۱۲۸/۸٪ گزارش شد که حاکی از افزایش رشد این جدایه در حضور نمک صفراوی بود. محققین مذکور در نهایت *ویسلا کونفوسا* را به عنوان یک باکتری دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مناسب معرفی نمودند (Lee et al., 2013). لی و همکاران (۲۰۱۶) نیز با بررسی قابلیت پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی دریافتند که میزان زنده‌مانی آنها در pH=۳ و در حضور ۰/۳٪ نمک صفراوی به ترتیب ۵۲/۵-۳۵/۵٪ و ۵۸/۵۳-۳۰/۴۱٪ بود. همچنین تمام این جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، کلرامفنیکول، سیکلوهگزامید، اریترمایسین، نئومایسین، استرپتومایسن، تتراسایکلین و ریفامپیسین حساس، ولی نسبت به ونکومایسین مقاوم بودند (Lee et al., 2016). اخیرا مانینی و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش سبوس گندم دریافتند که خمیرترش نیز می‌تواند به عنوان یک

منبع غنی از باکتری‌های اسید لاکتیک با ویژگی‌های منحصر به فرد تکنولوژیکی و پروبیوتیکی در نظر گرفته شود. این محققین توانستند باکتری‌های *لویکونستوک مزنتروئیدس*، *لویکونستوک سیترئوم*، *لاکتوباسیلوس* برویس، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*، *لاکتوباسیلوس سیکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* را از خمیرترش سبوس گندم، جداسازی و با روش‌های مولکولی شناسایی کنند. نتایج این مطالعه همچنین نشان داد که *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* CE65، یک باکتری با ویژگی‌های ایده‌آل پروبیوتیکی است. باکتری مذکور از زنده‌مانی قابل قبولی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بود و به واسطه تولید متابولیت‌های ضد میکروبی مانند اگزوپلی‌ساکاریدها قابلیت ضد قارچی و ضد لیستریایی مناسبی داشت (Manini et al., 2016).با توجه به اهمیت جدایه‌های لاکتیکی پروبیوتیک برای استفاده به عنوان کشت آغازگر در فرآوری محصولات مختلف، جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از اکوسیستم‌های تخمیری غذایی نظیر انواع خمیرترش که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه نیز با هدف ارزیابی رابطه فیلوژنتیکی و خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو به عنوان یک زیستگاه غنی برای این میکروارگانیسم‌ها به اجرا درآمد.

مواد و روش کار

این مطالعه تجربی در پاییز و زمستان ۱۳۹۴ در دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. ابتدا پس از تهیه آرد کامل جو با محتوای ۱۱/۶ درصد پروتئین، ۶۱/۷ درصد کربوهیدرات و ۱/۹ درصد خاکستر (بر اساس روش‌های آزمون ۱۰-۴۶ پروتئین، ۲۱-۳۹ کربوهیدرات و ۰۱-۰۸ خاکستر AACC, 2010) از مخلوط آن با آب، خمیرترش تهیه شد (Zannini et al., 2009). سپس برای جداسازی فلور لاکتیکی غالب خمیرترش تولیدی از کشت سطحی سوسپانسیون خمیرترش پس از چهار بار تکرار فرایند مایه‌گیری (افزودن بخشی از خمیرترش روز قبل به خمیرترش تولیدی) استفاده گردید (Sadeghi et al., 2016). باکتری‌های غذازاد شاخص مورد استفاده در این مطالعه شامل *اشریشیا کلی* (PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *لیستریا منوسیتوژنز* (PTCC 1298) و *سالمونلا انتریکا* (PTCC 1709) از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند. محیط‌های کشت میکروبی و مواد شیمیایی مصرفی نیز از شرکت مرک آلمان خریداری گردیدند. پس از جداسازی و شناسایی اولیه باکتری‌های اسید لاکتیک غالب خمیرترش آرد کامل جو به کمک معیارهای فنوتیپی مانند شکل کلنی و مورفولوژی سلولی، رنگ‌آمیزی گرم و فعالیت کاتالازی، DNA جدایه‌ها استخراج (Gene All، کره جنوبی) و توسط PCR دارای پرایمر اختصاصی، تکثیر و متعاقبا محصولات PCR، توالی-یابی (MWG، آلمان) گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این واکنش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده برای آزمون PCR شناسایی جدایه‌های لاکتیکی

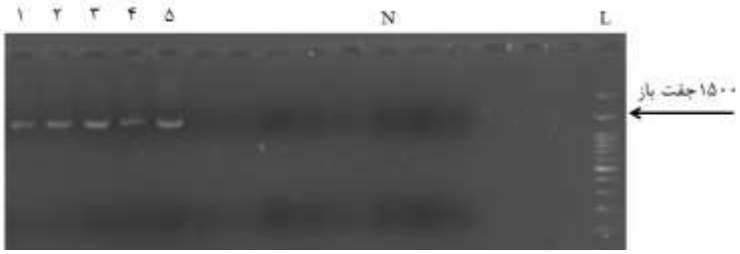
میزان اختصاصیت پرایمر	توالی پرایمر ′۵ به ′۳	طول توالی هدف	مرجع
باکتری اسید لاکتیک	F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: GGTTACCTTGTTACGACTT	۱۵۰۰ جفت باز	Leite et al., 2015

واکنش PCR در حجم نهایی ۳۰ میکرو لیتر شامل ۱۵ میکرو لیتر Red 2X Master Mix (آمپلیکون، دانمارک)، ۰/۵ میکرو لیتر از هر پرایمر، ۳ میکرو لیتر DNA و ۱۱ میکرو لیتر آب مقطر در دستگاه ترموسایکلر (کوربت CG1-96، استرالیا) صورت گرفت. در مرحله اول تکثیر توالی هدف، واسرشت DNA با شروع داغ ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آغاز گشته و طی ۳۰ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سرانجام، مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه پیدا کرد (Leite et al., 2015). پس از شناسایی جدایه‌های لاکتیکی، میزان زنده‌مانی آنها در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بر اساس روش ژانگ و همکاران (۲۰۱۱) بررسی شد (Zhang et al., 2011). بدین منظور پس از جداسازی مایع رویی فاقد باکتری با ۵ دقیقه سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه (هرمل Z-323K، آلمان)، رسوب باقیمانده به نحوی که جمعیت نهایی باکتری در آن به 1×10^{8} پرگنه در هر میلی‌لیتر برسد در محلول بافر فسفات حاوی اسید کلریدریک یک نرمال با pH معادل ۲ حل گردید. سپس سوسپانسیون میکروبی دارای جذب معادل نیم مک فارلند هر جدایه لاکتیکی به مدت ۴ ساعت در مجاورت غلظت ۰/۳٪ نمک صفراوی قرار داده شد و پس از زمان مذکور، تعداد باکتری زنده در مقایسه با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد صفرا) تعیین گردید (Nikoskelainen et al., 2003; Zhang et al., 2011).فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی نیز با استفاده از روش انتشار چاهک مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا ۴۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون هر باکتری شاخص (OD_{600}=۰/۱۵) با سوآب سرپنبه‌ای استریل بر روی محیط MHA[3] به طور سطحی کشت داده شد. سپس به کمک پیپت پاستور استریل، چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط، حفر و ۴۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون جدایه لاکتیکی فعال شده با OD_{600}=۰/۱۵ به داخل چاهک تلقیح گردید. قطر هاله عدم رشد باکتری شاخص نیزپس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به کمک نرم‌افزار Image J نسخه ۱/۴۱ تعیین شد (Simsek et al., 2006). پس از بررسی فعالیت ضد باکتریایی به منظور ارزیابی خاصیت تجمعی جدایه‌های لاکتیکی با *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* (عوامل عفونی روده)، سلول‌های حاصل از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های لاکتیکی توسط سانتریفوژ یخچال‌دار (مطابق مرحله قبل)، جدا و دو بار توسط بافر فسفات، شستشو داده شد. سپس مخلوط دارای حجم‌های مساوی از سوسپانسیون هر کدام از جدایه‌های لاکتیکی و سوسپانسیون باکتری شاخص مورد نظر تهیه گردید. جذب نوری سوسپانسیون‌های مذکور نیز پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد (اسپکتروفتومتر PG اینسترومنتز، انگلستان) و بر اساس رابطه ذیل، میزان خاصیت تجمعی محاسبه گردید. در این رابطه AP جذب سوسپانسیون باکتری شاخص، Alac جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و Amix جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری شاخص می‌باشد (Zhang et al., 2011). [(AP+Alac)/2 – (Amix)/ (AP+Alac)/2]*100مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیز با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بررسی گردید. ابتدا ۲۰۰ میکرو لیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های لاکتیکی به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت MRS حاوی یک درصد آگار (دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) افزوده شد و سپس بر سطح پلیت‌های از پیش آماده شده حاوی ۱۵

3. Muller Hinton Agar

میلی‌لیتر محیط کشت MRS آگار ۱/۵ درصد جامد شده، تلقیح گردید. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی سطح این پلیت‌ها قرار گرفت و پلیت‌های مذکور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردیدند. در پایان زمان گرمخانه‌گذاری با توجه به قطر هاله عدم رشد کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر (مقاوم)، ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر (حساسیت نسبی) و بیشتر از ۲۰ میلی‌متر (حساس)، مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد ارزیابی تعیین شد (Rojo-Bezares et al., 2006). برای بررسی رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های لاکتیکی ابتدا از نرم افزار BioEdit نسخه ۷,۲,۵ و پایگاه اطلاعاتی multalin (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/) به ترتیب به منظور تعیین تنوع نوکلئوتیدی و تفاوت ردیف نوکلئوتیدی توالی هدف PCR استفاده شد. سپس به کمک آنالیز ایندکس عدم توافق[4] بر اساس فاصله ترکیب نوکلئوتیدی این توالی‌ها، هاپلوتیپ‌ها با استفاده از نرم افزار MEGA نسخه ۷ مورد مطالعه قرار گرفتند. در نهایت توالی‌های مذکور با استفاده از رویه CLUSTAL موجود در نرم‌افزار MEGA همردیف و سپس نمودار درختی با استفاده از رویه بیشترین درست‌نمایی[5] به کمک نرم افزار MEGA ترسیم گردید. به منظور تایید درخت ترسیم شده نیز از روش Bootstrap (با تعداد ۱۰۰۰) در نرم‌افزار MEGA استفاده به عمل آمد (Kristensen et al., 2011).تایج حاصل از این پژوهش نیز با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی-داری ۰/۰۵ با سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد. **نتایج** ارزیابی اولیه تکثیر توالی هدف PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در شکل ۱ نشان داده شده است که موید تکثیر اختصاصی قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی می‌باشد. نتایج توالی‌یابی این محصولات PCR نیز پس از مقایسه توالی‌های مذکور با داده‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI[6] منجر به شناسایی *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس کوریا*، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *ویسلا سیباریا* به عنوان جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو شد.نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی مذکور در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در جدول ۲ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می-گردد *لاکتوباسیلوس برویس* در مقایسه با جدایه‌های دیگر به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از زنده‌مانی بیشتری در pH=۲ و نمک صفراوی ۰/۳٪ برخوردار بود. علاوه بر این، زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کوریا* در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از سایر جدایه‌های لاکتیکی کمتر بود و همچنین بین میزان رشد *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *ویسلا سیباریا* در pH=۲ اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) مشاهده نگردید ولی میزان رشد *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در حضور نمک صفراوی بیشتر از *ویسلا سیباریا* بود.

4. Disagreement index analysis
5. Maximum likelihood
6. National Center for Biotechnology Information



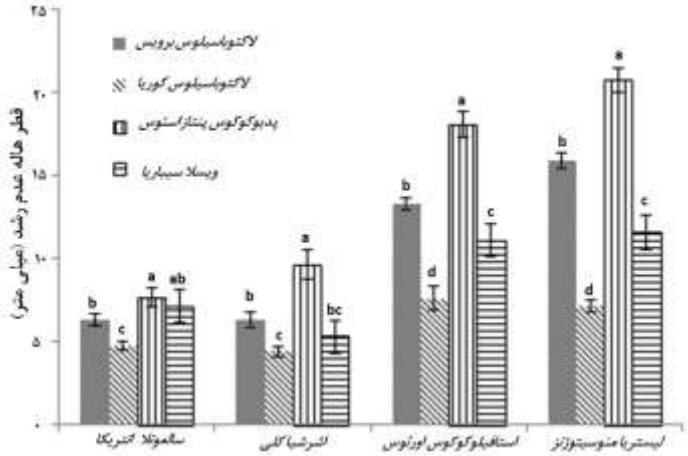
شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف ۱۵۰۰ جفت بازی جهت شناسایی پرگنه جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو (لاین ۱ تا ۴) در مجاورت مارکر ۳ کیلو جفت بازی (لاین L) و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* sp. (PTCC 1332) (لاین ۵) و کنترل منفی یا فاقد باکتری (لاین‌های N).

جدول ۲- درصد زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو در pH=۲ و نمک صفراوی ۰/۳٪

باکتری	pH			نمک صفراوی		
	کنترل	pH=۲	درصد زنده‌مانی	کنترل	نمک ۰/۳٪	درصد زنده‌مانی
	log CFU/ml	log CFU/ml		log CFU/ml	log CFU/ml	
لاکتوباسیلوس برویس	۷/۲۴±۰/۱۰	۶/۰۲±۰/۰۵	۸۳/۲۰±۰/۸۸[a]	۷/۱۷±۰/۱۴	۶/۱۹±۰/۲۷	۸۶/۳۶±۴/۹۷[a]
لاکتوباسیلوس کوریا	۷/۵۱±۰/۱۳	۱/۳۱±۰/۱۷	۱۷/۴۸±۲/۵۰[d]	۷/۱۱±۰/۱۸	۲/۹۳±۰/۱۴	۴۱/۲۵±۱/۷۱[d]
پدیوکوکوس پنتازاسئوس	۷/۲۷±۰/۰۹	۳/۵۱±۰/۳	۴۸/۴۰±۴/۹۴[b]	۷/۲۴±۰/۱۲	۳/۹۶±۰/۱۶	۵۴/۸±۱/۷۳[c]
ویسلا سیباریا	۷/۲۶±۰/۲۴	۳/۰۹±۰/۱۵	۴۲/۴۹±۰/۹۵[bc]	۶/۹۸±۰/۱۰	۵/۴۹±۰/۴۶	۷۸/۶۶±۵/۵۶[ab]

حروف مشابه در هر ستون، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

قطر هاله عدم رشد *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* تحت تاثیر *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از سه جدایه لاکتیکی دیگر بیشتر بود اما تاثیر بازدارندگی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی *سالمونلا انتریکا* با تاثیر *ویسلا سیباریا* اختلاف معنی-داری نداشت. پس از *پدیوکوکوس پنتازاسئوس نیز* *لاکتوباسیلوس برویس* از قابلیت بازدارندگی بیشتری بر روی *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا منوسیتوژنز* برخوردار بود. همچنین قابلیت آنتاگونیستی *لاکتوباسیلوس کوریا* در مقایسه با سایر جدایه‌ها در برابر باکتری‌های شاخص مورد بررسی به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) کمتر بود



شکل ۲- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های شاخص تحت تاثیر جدایه‌های لاکتیکی. حروف مشابه در مورد هر باکتری شاخص، نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

مقایسه قابلیت تجمعی جدایه‌های لاکتیکی با *اشریشیا کلی* نیز نشان داد که *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *لاکتوباسیلوس برویس* در مقایسه با دو جدایه لاکتیکی دیگر به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از توانمندی بیشتری در این خصوص برخوردار بودند. همچنین خاصیت تجمعی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *ویسلا سیباریا* با *سالمونلا انتریکا* به شکل معنی‌داری (P<۰/۰۵) از دو جدایه دیگر بیشتر بود. علاوه بر این، قابلیت تجمعی هر چهار جدایه لاکتیکی در برابر *سالمونلا انتریکا* نسبت به *اشریشیا کلی* کمتر بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه درصد خاصیت تجمعی جدایه‌های لاکتیکی با *اشرشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا*

باکتری	*اشریشیا کلی*	*سالمونلا انتریکا*
لاکتوباسیلوس برویس	۳۱/۲۶±۰/۷^{Ab}	۱۵/۳۳±۰/۸۲^{Bc}
لاکتوباسیلوس کوریا	۱۸/۰۶±۱/۳۷^{Ad}	۱۲/۱±۰/۹۲^{Bd}
پدیوکوکوس پنتازاسئوس	۳۶/۸۵±۱/۸^{Aa}	۲۳/۶۳±۱/۷۴^{Ba}
ویسلا سیباریا	۲۱/۳±۱/۱۹^{Ac}	۱۹/۶۵±۱/۱۸^{Ab}

حروف متفاوت کوچک و بزرگ لاتین به ترتیب، موید تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) در هر ستون و در هر ردیف می‌باشند.

نتایج حاصل از مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج نیز نشان داد که هر چهار جدایه مورد بررسی در برابر ونکومایسن مقاوم بودند. علاوه بر این، *ویسلا سیباریا* در برابر سایر آنتی‌بیوتیک‌ها حساس بود ولی *لاکتوباسیلوس کوریا* علاوه بر ونکومایسین در برابر اسید نالیدیکسیک نیز از خود مقاومت نشان داد. همچنین *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر تتراسایکلین، استرپتومایسین، جنتامایسن، کانامایسین و اسید

نالیدیکسیک و *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر استرپتومایسین، کانامایسن و اسید نالیدیکسیک از خود مقاومت نشان دادند (جدول ۴).

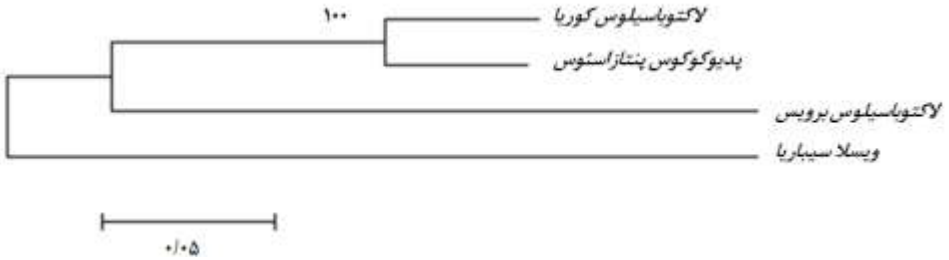
جدول ۴- مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج

آنتی‌بیوتیک (میکرو گرم ماده موثره)	*لاکتوباسیلوس برویس*	*لاکتوباسیلوس کوریا*	*پدیوکوکوس پنتوزاسئوس*	*ویسلا سیباریا*
نورفلوکساسین (۱۰)	حساس	حساس	حساسیت نسبی	حساس
تتراسایکلین (۳۰)	حساس	حساس	مقاوم	حساس
اریترومایسین (۱۵)	حساس	حساس	حساسیت نسبی	حساس
استرپتومایسین (۲۵)	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
پنی‌سیلین (۱۰)	حساس	حساس	حساس	حساس
جنتامایسین (۱۰)	حساس	حساس	مقاوم	حساس
سفالکسین (۳۰)	حساس	حساس	حساسیت نسبی	حساس
کلرامفنیکل (۳۰)	حساس	حساس	حساس	حساس
کلیندامایسین (۲)	حساس	حساس	حساسیت نسبی	حساس
کانامایسین (۳۰)	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
سفتریاکسون (۳۰)	حساس	حساس	حساسیت نسبی	حساس
اسید نالیدیکسیک (۱۰)	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس
ونکومایسین (۳۰)	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
آمپی‌سیلین (۱۰)	حساس	حساس	حساس	حساس

فاصله ترکیب نوکلئوتیدی در بین چهار جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد جو نیز نشان داد که بیشترین فاصله ژنتیکی بین *لاکتوباسیلوس برویس* و *ویسلا سیباریا* وجود دارد. همانطور که در ماتریکس آنالیز عدم توافق (جدول ۵) نیز ملاحظه می‌شود در مجموع بر اساس نتایج همردیفی توالی‌ها، چهار هاپلوتیپ برآورد گردید که ترسیم صحیح درخت فیلوژنتیکی بر اساس رویه بیشترین درست‌نمایی را برای جدایه‌های لاکتیکی تایید می‌کند. آنالیز درخت فلیوژنتیکی توالی‌های همردیف شده همچنین نشان داد که دو سویه *لاکتوباسیلوس کوریا* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دارای قرابت فیلوژنتیکی بسیار زیادی به یکدیگر می‌باشند (شکل ۳).

جدول ۵- ماتریکس آنالیز ایندکس عدم توافق برای توالی هدف PCR در جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو

جدایه لاکتیکی	***لاکتوباسیلوس برویس***	***لاکتوباسیلوس کوریا***	***پدیوکوکوس پنتازاسئوس***	***ویسلا سیباریا***
لاکتوباسیلوس برویس	۰			
لاکتوباسیلوس کوریا	۰/۲۹۶	۰		
پدیوکوکوس پنتازاسئوس	۰/۲۹۲	۰/۰۸۵	۰	
ویسلا سیباریا	۰/۴۱۸	۰/۳۵۲	۰/۳۵۰	۰



شکل ۳- رابطه فیلوژنتیکی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو بر اساس رویه بیشترین درست‌نمایی. خط نشانه، ۰/۰۵ جایگزینی در هر ۱۰۰ نوکلئوتید را نشان می‌دهد.

بحث

پروبیوتیک‌ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی و عوامل مدیریتی عفونت‌های روده‌ای شناخته شده، با مکانیسم‌های متعددی که اساساً شامل مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی، تجمع در سطوح مخاطی روده و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها است به رقابت در کسب مواد غذایی و تکثیر با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌پردازند (Leroy and De Vuyst, 2004). با وجود این که صرفا مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی جهت پیش-بینی زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در شرایط واقعی دستگاه گوارش کافی به نظر نمی‌رسد اما از آنجا که این خصوصیات برای حفظ بقاء و فعالیت میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در دستگاه گوارش ضروری هستند از آنها به عنوان مهم‌ترین شاخصه‌ها و همچنین روشی جهت غربالگری این میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شود (Fernandez et al., 2003; Schillinger et al., 2005). مقاومت بالای بعضی از باکتری‌های اسید لاکتیک نسبت به pH پایین می‌تواند به دلیل تولید ترکیباتی مانند انواع پلی‌ساکاریدها باشد که از اثر اسید بر روی غشای سلولی آنها ممانعت می‌کند (Vinderola and Reinheimer, 2003). عواملی نظیر اثر محافظتی ماتریکس ماده غذایی و قابلیت هیدرولیز نمک‌های صفراوی نیز در افزایش مقاومت این باکتری‌ها نسبت به نمک صفراوی تأثیرگذار هستند. علاوه بر این، مقاومت به صفرا عامل مهمی در تجمع باکتری‌های اسید لاکتیک به شمار می‌آید و تحمل شرایط اسیدی نیز می‌تواند به حضور موثرتر این باکتری‌ها در اکوسیستم‌های تخمیری منجر گردد (Saarela et al., 2000). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از زنده‌مانی جدایه‌های مورد بررسی به ویژه *لاکتوباسیلوس برویس* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش بود. در کنار مقاومت به اسید و نمک-های صفراوی، پروبیوتیک‌ها باید از خواص ضد میکروبی قابل قبول و توانایی تجمع بر ضد عوامل عفونی روده برخوردار باشند. اخیراً گزارش‌های متعددی درباره فعالیت‌های ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی (Assohoun-Djeni et al., 2016; Cabellero et al., 2016; Lee et al., 2011) و فعالیت ضد قارچی آنها (Oliveira et al., 2014; El-Mabrok et al., 2013; Gerbaldo et al., 2012) و همچنین امکان استفاده از این باکتری‌ها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی به جای افزودنی‌های شیمیایی (به دلیل خطر ابتلا به برخی از بیماری‌های خاص و سرطان) و آنتی‌بیوتیک‌ها (به دلیل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی) گزارش شده است. جدایه‌های لاکتیکی پروبیوتیک با تولید ترکیبات ضد میکروبی متنوع نظیر اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پراکسید هیدروژن، روتروسایکلین، پپتیدهای

ضد قارچی و انواع باکتریوسین‌ها در این امر موثرند (Leroy and De Vuyst, 2004). توانایی اتصال باکتری‌های پروبیوتیک به عوامل بیماری‌زا نیز در خاصیت آنتاگونیسمی آنها با ممانعت از اتصال و تجمع میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا خصوصا در نواحی آسیب دیده دستگاه گوارش بسیار موثر است. خاصیت آبگریزی دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان یک عامل فیزیکوشیمیایی در اتصال این باکتری‌ها به پوشش دستگاه گوارش و همچنین در اتصال آنها به باکتری‌های بیماری‌زا نقش اساسی ایفا می‌کند. اگر چه عامل اصلی این اتصال در باکتری‌های اسید لاکتیک، پروتئین‌های سطح سلول و اسیدهای تئیکوئیک هستند اما شروع این واکنش به خاصیت آبگریزی پوشش سلولی آنها وابسته است. البته این خاصیت در باکتری‌های اسید لاکتیک کاملا متغیر و عموما بسته به جنس و نژاد متفاوت می‌باشد (Collado et al., 2007; Grzeskowiak et al., 2011). نتایج تحقیقات اخیر (Assohoun-Djeni et al., 2016; Cabellero et al., 2016; Lee et al., 2011) مطابق با نتایج این پژوهش، نشان داده است که جدایه‌های لاکتیکی به دست آمده از محصولات تخمیری از توان ضد باکتریایی مناسب و خاصیت تجمعی قابل قبولی در مقابل بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا برخوردار می‌باشند. با توجه به این حقیقت که مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های بیماری‌زا هر روزه در حال افزایش می‌باشد لذا ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌های پروبیوتیک از دیدگاه ایمنی مصرف کننده امری ضروری به نظر می‌رسد. باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک متعلق به جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لویکونوستوک*، *پدیوکوکوس* و *استرپتوکوکوس* عموما نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های متداول مورد استفاده در مراکز درمانی حساس هستند. در مقابل، به نظر می‌رسد که برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک به واسطه فقدان سیتوکروم‌های ناقل الکترون و همچنین نفوذ ناپذیری غشاء سیتوپلاسمی به طور ذاتی نسبت به آمینوگلیکوزیدها و کوئینولون‌ها مقاوم باشند. علاوه بر این، مقاومت برخی از کوکسی‌های گرم مثبت به کوئینولون‌ها نیز به وقوع جهش در ژن‌های ویژه‌ای از آنها تحت تیمار آنتی‌بیوتیکی نسبت داده می‌شود (Hummel et al., 2007; Dzidic et al., 2008). با این حال، الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک حتی در گونه‌های مختلف یک جنس باکتریایی نیز ممکن است کاملا متفاوت باشد. از طرفی اگر چه عموما ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک در ژنوم غیر کروموزومی باکتری‌ها مشاهده می‌شود اما ژن مقاومت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها به طور ذاتی در نواحی حفاظت شده سویه‌های مختلفی از باکتری‌های اسید لاکتیک وجود دارد. اخیرا استفاده از این باکتری‌ها در فرآورده‌های غذایی پروبیوتیک برای جایگزین نمودن فلور میکروبی از دست رفته دستگاه گوارش طی درمان‌های آنتی‌بیوتیکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Dzidic et al., 2008). مقاومت پروبیوتیک‌ها به ونکومایسین نیز به واسطه عملکرد ویژه این آنتی‌بیوتیک در برابر عفونت‌های حاد ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به داروهای ترکیبی حائز اهمیت است. یکی از دلایل مقاومت باکتری‌های اسید لاکتیک به این آنتی‌بیوتیک نیز حضور اسید آمینه انتهایی D-آلانین به جای D-لاکتات یا D-سرین در باکتری‌های مذکور می‌باشد (Hummel et al., 2007; Jeong and Lee, 2015). تا کنون، محققین مختلفی با استفاده از تکنیک‌های مولکولی معتبر، فلور میکروبی خمیرترش‌های مختلف را شناسایی و روابط فیلوژنتیکی آنها را ارزیابی کرده‌اند (De Vuyst et al., 2002; Randazzo et al., 2005). خمیرترش آرد جو یکی از اکوسیستم‌های تخمیری غلات است که علیرغم قدمت دیرینه، فلور میکروبی آن کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. با توصیف روابط شجره‌ای در بین میکروارگانیسم‌های موجود در اکوسیستم‌های تخمیری مختلف می‌توان دریافت که آنها چگونه تکامل یافته‌اند. از

اواسط دهه ۱۹۸۰ با استفاده از زمان‌سنج‌های مولکولی و تکنیک‌های مستقل از کشت مبتنی بر آنها توصیف واقعی تنوّع فلور میکروبی چنین اکوسیستم‌هایی امکان‌پذیر گردیده است. بدین منظور پس از اجرای همردیفی، روابط تکاملی در بین این ارگانیسم‌ها به وسیله بازسازی شجره‌ای بر اساس موقعیت ژن‌های یکسان تعیین می‌گردد. سه شیوه کلّی برای ایجاد یک همردیفی مبتنی بر درخت‌های فیلوژنتیکی شامل روش‌های اتصال همسایه[7]، پارسیمونی[8] و بیشترین درست‌نمایی وجود دارد. روش سوم، دقیق‌ترین روش اما در عین حال دارای کمترین سرعت بوده و صرفا قابلیت بررسی مجموعه داده‌های کوچک را داراست. در این شیوه، حداکثر احتمال ممکن برای تخمین شکل درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته و منجر به ارائه یک مدل تکاملی می‌گردد. با درک اثرات متقابل مکانی و دینامیکی جمعیت میکروبی، استفاده از تخمیر در تولید فراورده‌های غذایی دارای مزایایی همچون قابلیت کنترل مناسب‌تر کیفیت و همچنین تولید فراورده‌ای ایمن‌تر می‌باشد (Weckx et al., 2010). بر اساس نتایج این پژوهش، *لاکتوباسیلوس برویس* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش آرد کامل جو از قابلیت بالایی برای استفاده به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک جهت تامین کشت آغازگر و یا کشت همراه در فرآوری محصولات تخمیری برخوردارند. جدایه‌های مذکور، علاوه بر زنده‌مانی بالا در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، از خاصیت ضد میکروبی مناسبی در برابر باکتری-های شاخص مورد مطالعه برخوردار بوده و به واسطه قابلیت تجمعی بر ضد *اشریشیا کلی* و *سالمونلا انتریکا* می‌توانند به شکل موثری ضمن جلوگیری از تجمع آنها در روده از دسترسی این عوامل عفونی به مواد غذایی نیز ممانعت نمایند. اگرچه مکانیسم‌های حفاظتی پروبیوتیک‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است اما به نظر می‌رسد که اثر آنتاگونیستی متابولیت‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها بر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، می‌تواند نقش مهمی در نگهداری محصولات غذایی و ایمنی مصرف کننده ایفا نماید.

7. Neighbor joining

8. Parsimony

منابع

1. AACC International. 2010. Approved methods of the American association of cereal chemists. 11th Ed. The St. Paul.

2. Assohoun-Djeni, N.M.C., Djeni, N.T., Messaoudi, S., Lhomme, E., Koussemon-Camara, M., Ouassa, T., Chobert, J.M., and Dousset, X. 2016. Biodiversity, dynamics and antimicrobial activity of lactic acid bacteria involved in the fermentation of maize flour for doklu production in Côte d'Ivoire. Food Control. 62: 397-404.

3. Cabellero, B., Finglas, P., and Toldrá, F. 2016. Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, New York, pp. 501-508.

4. Collado, M.C., Surono, I., Meriluoto, J., and Salminen, S. 2007. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. J Food Sci. 72: 89-93.

5. Corsetti, A., Settanni, L., Braga, T.M., Silva Lopes, M.F., and Suzzi, G. 2008. An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. LWT- Food Sci Technol. 41: 1173-1182.

6. 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. Appl Environ Microbiol. 68: 6059-6069.

7. Dzidic, S., Suskovic, J., and Kos, B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria:

biochemical and genetic aspects. Food Tech Biotech. 46: 11-21.

8. El-Mabrok, A.S.W., Hassan, Z., Mokhtar, A.M., and Hussin, K.M. 2013. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* LAB-C5 and LAB-G7 isolated from Malaysian fruits. Acta Biol Malaysiana. 2: 22-30.

9. Fernandez, M., Boris, S., and Barbes, C. 2003. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. J Appl Microbiol. 94: 449-455.

10. Gaspar, P.L., Carvalho, A., Vinga, S., Santos, H., and Neves, A.R. 2013. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. Biotechnol Adv. 31: 764-788.

11. Gerbaldo, G.A., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A., and Barberis, L. 2012. Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties. FEMS Microbiol Lett. 332: 27-33.

12. Grzeskowiak, L., Collado, M.C., Vesterlund, S., Mazurkiewicz, J., and Salminen, S. 2011. Adhesion abilities of commensal fish bacteria by use of mucus model system. Aquaculture. 318: 33-36.

13. Hummel, A.S., Hertel, C., Holzapfel, W.H., and Franz, C. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 73: 730-739.

14. Jeong, D.W., and Lee, J.H. 2015. Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. LWT-Food Sci Technol. 64: 1078-1084.

15. Kristensen, D.M., Wolf, Y.I., Mushegian, A.R., and Koonin, E.V. 2011. Computational methods for Gene Orthology inference. Brief Bioinform. 12: 379-391.

16. Lee, J.H., Li, X., and O'Sullivan, D. 2011. Transcription analysis of a lantibiotic gene cluster from *Bifidobacterium longum* DJO10A. Appl Environ Microb. 77: 5879-5887.

17. Lee, K.W., Park, J.Y., Jeong, H.R., Heo, H.J., Han, N.S., and Kim, J.H. 2013. Probiotic properties of *Weissella* strains isolated from human faeces. Anaerobe. 18: 96-102.

18. Lee, L.W., Shim, J.M., Park, S.K., Heo, H.J., Kim, H.J., and Ham, H.K. 2016. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. LWT-Food Sci Technol. 71: 130-137.

19. 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 isolated from Brazilian kefir grains. J Dairy Sci. 6: 3622-3632.

20. Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Tech. 5: 67-78.

21. Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., and Plumed-Ferrer, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. LWT-Food Sci Technol. 66: 275-283.

22. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., and Lilius, E.M. 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shellfish Immun. 15: 443-452.

23. Oliveira, P.M., Zannini, E., and Arendt, E.K. 2014. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. Food Microbiol. 37: 78-95.

24. Patil, M.M., Pal, A., Anand, T., and Ramana, K.V. 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. Indian J Biotech. 9: 166-172.

25. Poutanen, K., Flander, L., and Katina, K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a

33. Simsek, O., Hilmi Con, A., and Tulumoglu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control. 17: 263-270.

34. Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., and Holzapfel, W.H. 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. J Appl Microbiol. 104: 465-77.

35. Vinderola, C.G., and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res Int. 36: 895-904.

36. Weckx, S., Van der Meulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., and De Vuyst, L. 2010. Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. Appl Environ Microbiol. 76: 5402-5408.

37. Zannini, E., Garofalo, C., Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., and Clementi, F. 2009. Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiol. 26: 744-753.

38. Zhang, Y., Zhang, L., Du, M., Yi, H., Guo, C., Tuo, Y., Han, X., Li, J., Zhang, L., and Yang, L. 2011. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. Microbiol Res. 167: 27-31.

nutritional perspective. Food Microbiol. 26: 693-699.

26. Randazzo, C.L., Heilig, H., Restuccia, C., Giudici, P., and Caggia, C. 2005. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. J Appl Microbiol. 99: 251-258.

27. Rojo-Bezares, B., Saenz, Y., Poeta, P., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. 2006. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. Int J Food Microbiol. 111: 234-240.

28. Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., and Bressollier, P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. LWT-Food Sci Technol. 50: 1-16.

29. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol. 84: 197-215.

30. Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M., and Sadeghi, B. 2016. Antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from whole barley sourdough. J Food Qual Hazards Control. 3: 30-36.

31. Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc, New York, USA.

32. Schillinger, U., Guigas, C., and Holzapfel, W.H. 2005. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. Int Dairy J. 15: 1289-1297.

Phylogenetic relationship and probiotic properties of dominant lactic acid bacteria isolated from whole barley sourdough

Ebrahimi M [1], Sadeghi A*[2], Sadeghi B[3]

1. PhD Student of Food Microbiology, Faculty of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

3. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman.

***Corresponding author**: *sadeghi.gau@gmail.com*

Received: 20 April 2017 Accepted: 22 June 2017

Abstract

The aims of this study were evaluating the probiotic properties and phylogenetic relationship of dominant lactic acid bacteria (LAB) isolated from whole barley sourdough. At the beginning, dominant LAB isolates were identified by specific PCR. Then probiotic properties of the isolates including survival in simulated conditions of gastrointestinal tract, antagonistic effects against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* as foodborne indicator bacteria, ability of aggregation with *E. coli and S. enterica* as infection agents of intestine and resistance of these LAB isolates against some of routine antibiotics were investigated. For determination of phylogenetic relationship between LAB isolates, maximum likelihood method was also used. Sequencing results of PCR products lead to identification of *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curieae*, *Pediococcus pentosaceus* and *Weissella cibaria* as dominant isolated LAB from whole barley sourdough. Among mentioned isolates, *L. brevis* had significantly ($P<0.05$) higher survival in pH 2 and 0.3% bile salt in comparison to other isolates. Inhibition zone diameter of foodborne indicator bacteria in the presence of *P. pentosaceus* was the highest. *P. pentosaceus* had also significantly ($P<0.05$) more effective aggregation ability towards *E. coli and S. enterica* than the others and four LAB isolates were resistant to vancomycin. Analysis of aligned sequences in phylogenetic tree showed that *L. curieae* and *P. pentosaceus* had very closely phylogenetic relationship while, the most genetic difference was observed between *L. brevis* and *W. cibaria*.

Keywords: Probiotic properties, Phylogenetic relationship, Barley sourdough, LAB isolate.