ارزیابی خواص ضد باکتریایی و پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج

معصومه احسان بخش[1]، علیرضا صادقی[1*]، مجتبی رئیسی[2]، مریم ابراهیمی[2]، مهدی کاشانی نژاد[1]

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

۲. مرکز تحقیقات سلامت غلات، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گلستان، گرگان، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۳۰

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی خواص پروبیوتیکی و ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج بود. بدین منظور، زنده‌مانی این جدایه‌ها در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، اثر آنتاگونیستی آنها در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی* و *سدوموناس پوتیدا* به عنوان شاخص‌های باکتریایی غذازاد، قابلیت تجمعی جدایه‌های مذکور در برابر *اشریشیا کلی* به عنوان عامل عفونی روده و همچنین الگوی مقاومت آنها در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج و قابلیت همولیز خون توسط این جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج، *لیستریا مونوسیتوژنز* از بین شاخص‌های باکتریایی، بیشترین حساسیت را در برابر هر دو جدایه لاکتیکی از خود نشان داد. علاوه بر این، بیشترین درصد بازدارندگی پالیده‌های کشت این جدایه‌های لاکتیکی به ترتیب در مورد فازهای لگاریتمی و سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* و فاز سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر *سودوموناس پوتیدا* مشاهده شد. همچنین *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در مقایسه با جدایه دیگر به شکل معنی‌داری از زنده‌مانی بیشتری در pH=۳ و نمک صفراوی ۰/۳ درصد برخوردار بود ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این، هر دو جدایه لاکتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلاکساسین و جنتامایسین مقاوم بودند. قابیلت تجمعی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* با *اشریشیا کلی* نیز به ترتیب معادل ۳۱/۵۲ و ۱۶/۹۰ درصد محاسبه شد و قابلیت همولیز خون توسط هر دو جدایه لاکتیکی نیز منفی بود.

واژگان کلیدی: جدایه لاکتیکی، خواص پروبیوتیکی، اثر ضد باکتریایی، خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی با تعداد مشخص به مصرف برسند در میزبان، اثرات سلامتی‌بخش به جای می‌گذارند. تحمل شرایط نامساعد دستگاه گوارش توسط این میکروارگانیسم‌ها باعث حفظ فلور میکروبی روده در حالت طبیعی، محافظت در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای معدی-روده‌ای، ارتقاء سیستم ایمنی، کاهش سطح کلسترول و فشار خون، فعالیت ضد سرطانی و بهبود دسترسی به مواد مغذی می‌شود (Tripathi and Giri, 2014). این گروه از میکروارگانیسم‌ها در قسمت‌های مختلف بدن به ویژه دهان، دستگاه گوارش و دستگاه تناسلی نقش مهمی در بازدارندگی از عفونت‌ها دارند (Picard et al, 2005). از بین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان مهم-ترین گروه شناخته می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های گرم مثبت، فاقد اسپور و کاتالاز منفی هستند که محصول اصلی تخمیرکربوهیدرات‌ها توسط آنها اسید لاکتیک می‌باشد. جنس‌های عمده باکتری‌های اسید لاکتیک که به عنوان پروبیوتیک مطرح هستند شامل لاکتوکوکوس، انتروکوکوس، لوکونوستوک، پدیوکوکوس، لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس است. این باکتری‌ها به عنوان کشت آغازگر و کشت همراه در صنایع لبنی، فراورده‌های گوشتی، سبزی‌ها و غلات به کار می‌روند (Picard et al, 2005; Purohit et al, 2012). بسیاری از گونه های باکتری‌های اسید لاکتیک به طور کلی به عنوان

ایمن[1] (GRAS) شناخته شده‌اند (Bories et al, 2008). مطالعات بالینی نیز اثرات مفید پروبیوتیک‌ها از قبیل تحریک سیستم ایمنی، خاصیت ضد سرطانی، اصلاح عدم تحمل لاکتوز و پیشگیری از اسهال را بر روی انسان و حیوانات نشان داده است. همچنین باکتری‌های پروبیوتیک با تولید متابولیت‌های ضد میکروبی نظیر باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی، رشد عوامل بیماری‌زا را مهار می‌کنند (Tamime, 2002).

پروبیوتیک‌ها به منظور ایجاد اثرات سودمند در بدن باید قادر به رشد در معده و روده بوده و توانایی اتصال به دیواره روده و سکونت در آن را نیز داشته باشند. به همین منظور باید مقاومت لازم جهت مواجهه با اسید کلریدریک معده و نمک‌های صفراوی موجود در روده کوچک در آنها وجود داشته باشد (Mojgani et al, 2007). یکی از خصوصیات مهم پروبیوتیک‌ها قابلیت اتصال[2] آنها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، توانایی خود اتصالی و همچنین اتصال به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌باشد که در چندین پژوهش، گزارش شده است (Collado and Meriluoto, 2008; Jankovic et al, 2012). دارا نبودن ویژگی‌های نامطلوب (فاکتورهای بیماری‌زایی[3] و توانایی انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی[4]) و همچنین ایمنی این میکروارگانیسم‌ها از عوامل مهم دیگر جهت انتخاب یک پروبیوتیک مناسب محسوب می‌شود (Angmo et al, 2016).

خمیرترش، مخلوطی از آب و آرد یا اجزاء آرد غلات است که توسط باکتری‌های اسید لاکتیک و مخمرها تخمیر شده باشد. این اکوسیستم تخمیری، جایگاه مناسبی برای جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک دارای قابلیت‌های ضد میکروبی و پروبیوتیکی به شمار می‌آید زیرا جدایه‌های لاکتیکی غالب آن به واسطه رقابت و غلبه بر فلور میکروبی ناخواسته از خصوصیات بارزتری در این زمینه برخوردارند (De Vuyst and Vancanneyt, 2007; Sadeghi et al, 2016). تاکنون مطالعات فراوانی در خصوص بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی و پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از فراورده‌های تخمیری غلات نظیر خمیرترش صورت گرفته است. به عنوان مثال، Sadeghi و Ebrahimi (۲۰۱۶) ضمن بررسی فعالیت پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های غالب جدا شده از خمیرترش آرد کامل گندم گزارش نمودند که *لاکتوباسیلوس برویس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از قابلیت بالایی برای استفاده به عنوان باکتری-های پروبیوتیک برای مصارف مختلف غذایی و دارویی برخوردارند. همچنین Manini و همکاران (۲۰۱۶) با مطالعه باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیرترش سبوس گندم (*لوکونوستوک مزنتریودس*، *لوکونوستوک سیتوورم*، *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*، *لاکتوباسیلوس سیکی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*) دریافتند که این باکتری‌ها دارای خواص پروبیوتیکی نظیر تحمل به اسید و صفرا و فعالیت آنتاگونیستی بر علیه لیستریا بودند. علاوه بر این، *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده به عنوان یک پروبیوتیک مناسب معرفی گردید.

Liu و همکاران (۲۰۱۳) نیز باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از محصولات تخمیری نظیر خمیرترش را برای تعیین فعالیت آنتاگونیستی علیه *اشریشیا کلی* تهاجمی (EIEC) و تحمل شرایط شبیه‌سازی شده روده بررسی کرده و دریافتند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* CCFM233 و CCFM231 دارای خواص پروبیوتیکی هستند. Lee و همکاران (۲۰۱۶) با جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک و ارزیابی تحمل آن‌ها به اسید و صفرا، میزان بقای *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده را به ترتیب ۱۰۰ و ۸۴/۲۱ درصد اعلام

1. Generally Recognized as Safe
2. Aggregation
3. Virulence
4. Transmissible antibiotic resistance

کردند. در پژوهش Angmo و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز ویژگی‌های پروبیوتیکی شامل تحمل به pH پایین و نمک صفراوی، قابلیت اتصال، تولید ترکیبات ضد میکروبی و فعالیت همولتیکی در ۲۵ باکتری اسید لاکتیک جدا شده از مواد غذایی و نوشیدنی تخمیری در هند بررسی شده و از بین ۱۰ جدایه با توانایی پروبیوتیکی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان پروبیوتیک در فرآوری شیر تخمیری مورد استفاده قرار گرفت.

Todorov و همکاران (۱۹۹۹) ترکیبات ضد باکتریایی تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را در خمیرترش، شناسایی و خصوصیات آن را مشخص کرده‌اند. simsek و همکاران (۲۰۰۶) نیز خواص ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی خمیرترش را بررسی کرده و به سویه‌هایی با قابلیت ضد میکروبی (*لاکتوباسیلوس برویس* زیرگونه *لیندری*، *لاکتوباسیلوس ویریدسنس*، *پدیوکوکوس* E5 و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*) دست یافتند. همچنین Cizeikiene و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی نان گندم را با روش انتشار چاهک، علیه برخی از باکتری‌های نامطلوب در مواد غذایی (*باسیلوس*، *سودوموناس*، *لیستریا*، *اشریشیا*) بررسی نمودند.

هدف از این پژوهش، بررسی خواص پروبیوتیکی و ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بود که قبلا به عنوان جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج با توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی تایید شناسایی شده بودند.

مواد و روش کار

- مواد اولیه

این مطالعه تجربی در پاییز و زمستان ۱۳۹۵ در دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به اجرا در آمد. مواد شیمیایی و محیط-های کشت مصرفی در این پژوهش نیز از شرکت مرک آلمان و کشت‌های لیوفیلیزه باکتری‌های *اشریشیا کلی* (*Esherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1298) و *سدوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida* PTCC 1694) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهیه و در محیط کشت برین هرت اینفوزیون (بی.اچ.آی) براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت فعال‌سازی شدند. باکتری‌های اسید لاکتیک شامل *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* مورد استفاده نیز از بین جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج که قبلا با توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی، تایید شناسایی شده بودند تامین گردید (Ehsanbakhsh et al, 2017).

- تعیین خواص ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی

برای ارزیابی خواص ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی و پالیده کشت آنها در برابر باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس پوتیدا* به ترتیب از روش‌های انتشار چاهک و میکرودایلوشن (ریز رقت) استفاده شد.

- روش انتشار چاهک

در این روش ابتدا جذب کشت‌های تازه جدایه‌های لاکتیکی و باکتری‌های بیماری‌زا به صورتی که جمعیت میکروبی آن‌ها معادل نیم مک فارلند باشد تنظیم شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زا بر روی محیط کشت حاوی بی.اچ.آی آگار به صورت سطحی کشت داده شد. پس از حدود ۳۰ دقیقه در مرکز این پلیت‌ها چاهک ایجاد گردید و مقدار ۵۰ میکرولیتر از کشت جدایه‌های لاکتیکی در این چاهک‌ها ریخته شد. سپس پلیت‌ها به

گرمخانه با دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و نتایج پس از ۲۴ ساعت به صورت هاله عدم رشد بررسی شد (Herreros et al, 2005).

- روش میکرودایلوشن

ابتدا فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی به روش کدورت سنجی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (پی.جی.آی،[1] انگلستان) با جذب خوانی در فواصل زمانی مشخص در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید (Gulahmadov et al, 2009). سپس برای مقایسه خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی از روش میکرودایلوشن استفاده شد. برای تهیه پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی، کشت حاصل از فاز-های رشد لگاریتمی و سکون آن‌ها با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (هانیل کومبای، کره جنوبی) گردید. سپس مایع رویی به دست آمده از فیلتر سرنگی (جت بیوفیل، چین) ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. شاخص‌های باکتریایی نیز در محیط کشت بی.اچ.آی براث کشت داده شدند و جمعیت آن‌ها به 1×10^{8} cfu/ml رسانده شد. سپس به هر چاهک میکروپلیت، حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر اضافه گردید. نمونه کنترل منفی، حاوی پالیده خام و شاخص‌های باکتریایی اتوکلاو شده، کنترل مثبت، حاوی محیط کشت دمن، روگوسا و شارپ (ام.آر.اس) براث و شاخص‌های باکتریایی و نمونه‌های دیگر حاوی پالیده‌های کشت جدایه‌های لاکتیکی و شاخص‌های باکتریایی بودند. در نهایت میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و توسط دستگاه الایزا ریدر (سدکو، روسیه) در طول موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت (Jorgensen and Ferraro, 2009).

- بررسی تحمل جدایه‌های لاکتیکی به اسید و صفرا

برای این منظور، ابتدا سوسپانسیون حاوی هر جدایه لاکتیکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس با حذف فاز بالایی، رسوب باقیمانده در محلول بافر فسفات حاوی اسید کلریدریک یک نرمال به pH معادل ۲ و ۳ رسانده شد به نحوی که جذبی معادل نیم مک فارلند داشته باشد. در ادامه، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در پایان زمان گرمخانه‌گذاری، در رقت‌های متوالی بافر فسفات استریل، رقیق‌سازی و باکتری‌ها شمارش گردیدند. علاوه بر این، سوسپانسیون دارای جذب نیم مک فارلند از هر جدایه به مدت ۴ ساعت در مجاورت غلظت ۰/۳ درصد نمک صفراوی قرار داده شد و تعداد باکتری زنده پس از زمان یاد شده با تعداد باکتری نمونه شاهد (فاقد صفرا) مقایسه گردید (Zhang et al, 2011).

- بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک

بدین منظور ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های اسید لاکتیک به ۴ میلی‌لیتر محیط کشت ام.آر.اس آگار یک درصد (نیمه جامد) اضافه گردید. سپس مخلوط مذکور بر روی سطح پلیت‌های از پیش آماده شده حاوی ۱۵ میلی‌لیتر ام.آر.اس آگار ۱/۵ درصد ریخته شد. در ادامه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک شامل آمپی‌سیلین، جنتامایسین، استرپتومایسین، سفازولین، سیپروفلاکساسین، پنی‌سیلین، سفالوتین، ایمپنم، نووبیوسین، کلیندامایسین، ونکومایسین، سفتریاکسون و نالیدیکسیک اسید (پادتن طب، ایران) بر روی سطح هر پلیت قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها اندازه‌گیری شده و به صورت مقاوم (قطر کمتر یا مساوی ۱۴ میلی‌متر)، حساسیت نسبی (قطر ۱۵ تا ۱۹ میلی‌متر) و حساس (قطر بیش از ۲۰ میلی-متر) گزارش گردید (Rojo-Bezares et al, 2006).

1. T80 Double Beam UV-Visible ،PGI

- بررسی خاصیت تجمعی جدایه‌های لاکتیکی با *اشریشیا کلی*

برای ارزیابی خاصیت تجمعی جدایه‌های لاکتیکی بر علیه *اشریشیا کلی* به عنوان یک عامل عفونی روده، مخلوطی از حجم‌های مساوی سوسپانسون جدایه‌های لاکتیکی و سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت گرمخانه-گذاری شدند. سپس جذب مخلوط سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و از طریق معادله ذیل، میزان خاصیت تجمعی محاسبه گردید. در این رابطه AP: جذب سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا، Alac: جذب سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و Amix: جذب مخلوط سوسپانسیون جدایه لاکتیکی و باکتری بیماری‌زا پس از ۴ ساعت می‌باشد (Zhang et al, 2011).

[(AP+Alac)/2-(Amix)/AP+Alac)/2]*100

- بررسی قابلیت همولیز خون

برای این منظور، جدایه‌های لاکتیکی بر روی سطح محیط کشت آگاردار حاوی ۵ درصد خون گوسفند، کشت داده شدند و پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ایجاد هاله و تغییر رنگ در محیط کشت بررسی شد (Angmo et al, 2016).

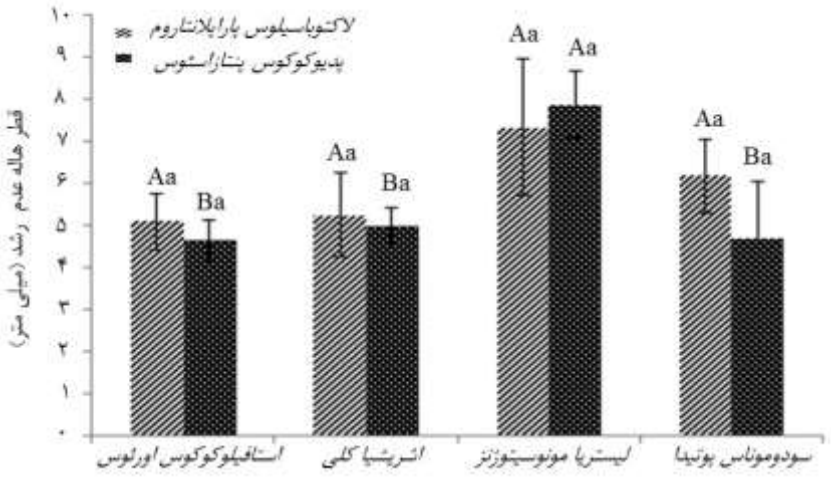
آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار اجرا شد و نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل گردیدند. علاوه بر این، مقایسه تفاوت بین اثر ضد میکروبی دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر بر روی یک عامل بیماری‌زا و همچنین مقایسه تفاوت بین زنده‌مانی دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش با استفاده از آزمون T صورت گرفت. برای آنالیز آماری و ترسیم نمودارها نیز به ترتیب نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۹ و Excel نسخه ۲۰۱۰ مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج

ارزیابی خواص ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*

نتایج حاصل از روش انتشار چاهک نشان داد که دو جدایه لاکتیکی از خاصیت ضد باکتریایی مناسبی برخوردار بودند (شکل۱). همانطور که مشاهده می‌گردد بیشترین تاثیر ممانعت‌کنندگی را *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* و بعد از آن *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در برابر همین باکتری بیماری‌زا داشت. علاوه بر این، کمترین قطر هاله عدم رشد جدایه‌های لاکتیکی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* دیده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین تاثیر *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر *لیستریا مونوسیتوژنز* در مقایسه با سایر باکتری‌های بیماری‌زا وجود داشت ($p<۰/۰۵$). اما اختلاف معنی‌داری بین ممانعت‌کنندگی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در برابر باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمون در این مطالعه دیده نشد. همانطور که در شکل۱ آمده است اختلاف معنی‌داری بین تاثیر بازدارنده دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر در برابر هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا نیز مشاهده نگردید.



شکل ۱- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا تحت تاثیر جدایه‌های لاکتیکی.

حروف کوچک ناهمسان، نشان‌گر اختلاف معنی‌دار بین تاثیر بازدارنده دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر در برابر هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا و حروف بزرگ ناهمسان، نشان‌گر اختلاف معنی‌دار بین تاثیر بازدارنده هر جدایه لاکتیکی در برابر چهار باکتری بیماری‌زا در سطح $p<۰/۰۵$ است.

- تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی

نتایج به دست آمده از تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون، نشان داد که *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*، ۱۷ ساعت پس از شروع زمان گرمخانه‌گذاری به انتهای فاز رشد لگاریتمی خود رسیدند. لذا برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت این جدایه‌ها در فازهای رشد لگاریتمی و سکون به ترتیب ۱۵ و ۱۹ ساعت پس از کشت جدایه‌ها، پالیده به روشی که قبلا توضیح داده شد تهیه گردید.

- خاصیت ضد باکتریایی پالیده‌های کشت *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*

نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضدباکتریایی پالیده‌های فاز لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی مورد پژوهش در جدول ۱ آمده است. همانطور که مشاهده می‌گردد پالیده‌های کشت حاصل از فاز لگاریتمی و سکون هر دو جدایه لاکتیکی در مقابل شاخص‌های باکتریایی مورد مطالعه دارای خاصیت بازدارندگی بودند. بر اساس این نتایج، بیشترین درصد بازدارندگی را پالیده‌های حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* دارا بودند. همچنین بیشترین تاثیر بازدارندگی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در فاز سکون و در برابر *سودوموناس پوتیدا* دیده شد. بین درصد بازدارندگی پالیده‌های کشت *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* با پالیده‌های کشت *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) وجود داشت. همچنین اختلاف معنی‌دار بین درصد بازدارندگی پالیده فاز لگاریتمی با فاز سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* فقط در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* دیده شد اما پالیده‌های *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* علاوه بر *استافیلوکوکوس اورئوس* در برابر *سودوموناس پوتیدا* نیز تاثیر بازدارندگی متفاوتی داشتند ($p<۰/۰۵$). علاوه بر این، هیچ یک از پالیده‌های دو جدایه لاکتیکی در برابر *اشریشیا کلی* تاثیر بازدارندگی معنی‌داری نشان ندادند. همانطور که در این جدول آمده است تاثیر بازدارندگی معنی‌دار پالیده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* با *سودوموناس پوتیدا* دیده شد. همچنین اختلاف معنی‌دار بین پالیده حاصل از فاز رشد لگاریتمی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر

استافیلوکوکوس اورئوس و *اشریشیا کلی* با *سودوموناس پوتیدا* و *لیستریا مونوسیتوژنز* مشاهده گردید (p<۰/۰۵).

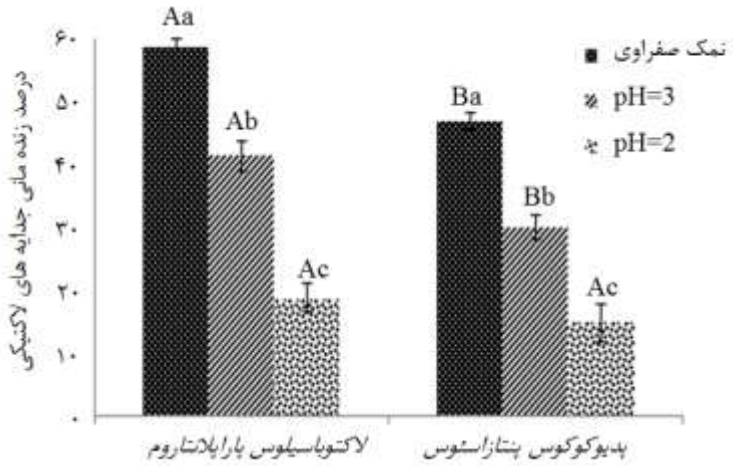
جدول ۱- مقایسه درصد بازدارندگی پالیده‌های حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا

	لیستریا مونوسیتوژنز	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*اشریشیا کلی*	*سودوموناس پوتیدا*
پالیده فاز لگاریتمی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*	Aa* ۱۰۰	Cc* ۶۳/۳۶±۰/۴۸	Ac* ۶۵/۱۳±۰/۱۴	Bb* ۷۹/۶۵±۰/۰۶
پالیده فاز سکون *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*	Aa* ۱۰۰	Bc* ۶۷/۸۰±۰/۱۳	Ac* ۶۵/۸۲±۱/۰۲	Bb* ۸۰/۸۴±۰/۰۱
پالیده فاز لگاریتمی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*	Bb* ۷۸/۶۴±۰/۵۶	Ac* ۶۹/۳۸±۰/۰۸	Ad* ۶۵/۱۹±۰/۴۹	Ba* ۷۹/۷۰±۰/۳۵
پالیده فاز سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس*	Bb* ۷۷/۵۸±۰/۵۲	Bc* ۶۷/۶۸±۰/۰۲	Ac* ۶۵/۰۲±۰/۰۶	Aa* ۹۶/۱۸±۷/۶۴

*حروف کوچک ناهمسان، نشان‌گر اختلاف معنی‌دار در هر ردیف و حروف بزرگ ناهمسان، نشان‌گر اختلاف معنی‌دار در هر ستون در سطح p<۰/۰۵ است.

- بررسی تحمل جدایه‌های لاکتیکی به اسید و صفرا

نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش در شکل۲ آمده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در مقایسه با جدایه دیگر از زنده‌مانی بیشتری در pH=۲، pH=۳ و نمک صفراوی ۰/۳ درصد برخوردار بود. همچنین بیشترین تحمل جدایه‌های لاکتیکی در تیمارهای فوق مربوط به صفرا ۰/۳ درصد بود. علاوه بر این، اختلاف معنی‌داری بین درصد زنده-مانی دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر در برابر هر یک از تیمارهای pH=۲ و صفرای ۰/۳ درصد وجود داشت (p<۰/۰۵) همچنین بین درصد زنده‌مانی هر یک از جدایه‌های لاکتیکی در برابر هر سه تیمار اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید.



شکل ۲- درصد زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های آرد سبوس گندم و سبوس برنج در pH های ۲ و ۳ و نمک صفراوی ۰/۳ درصد. حروف بزرگ ناهمسان، نشان‌گر اختلاف معنی‌دار بین درصد زنده‌مانی دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر در برابر هر یک از تیمارهای pH و یا صفرا و حروف کوچک ناهمسان، نشان‌گر اختلاف معنی‌دار بین درصد زنده‌مانی هر جدایه لاکتیکی در برابر هر سه تیمار است.

- الگوی مقاومت جدایه‌های لاکتیکی به آنتی‌بیوتیک

نتایج حاصل از مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی نشان داد که *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلاکساسین و جنتامایسین مقاوم بودند (جدول۲). بیشترین قطر هاله عدم رشد *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در مجاورت آمپی‌سیلسن و *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* در مجاورت سفتریاکسون مشاهده شد. همچنین کمترین حساسیت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های نالیدیکسیک اسید، سیپروفلاکساسین و جنتامایسین وجود داشت. علاوه بر این، هر دو جدایه لاکتیکی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و سفالوتین حساسیت نشان دادند.

جدول ۲- مقاومت جدایه‌های لاکتیکی در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج

آنتی‌بیوتیک (میکروگرم ماده موثره)	*لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم*	*پدیوکوکوس پنتازاسئوس*
آمپی‌سیلین (۱۰)	حساس	حساس
ونکومایسین (۳۰)	مقاوم	مقاوم
استرپتومایسین (۱۰)	مقاوم	مقاوم
سفازولین (۳۰)	مقاوم	حساسیت نسبی
نالیدیکسیک اسید (۳۰)	مقاوم	مقاوم
سیپروفلاکساسین (۵)	مقاوم	مقاوم
پنی‌سیلین (۱۰)	مقاوم	حساسیت نسبی
سفتریاکسون (۳۰)	حساس	مقاوم
سفالوتین (۳۰)	حساس	حساس
ایمپنم (۱۰)	حساس	حساسیت نسبی
کلیندامایسین (۲)	مقاوم	حساس
نووبیوسین (۵)	حساس	حساسیت نسبی
جنتامایسین (۱۰)	مقاوم	مقاوم

- خاصیت تجمعی جدایه‌های لاکتیکی با *اشریشیا کلی*

قابیلت تجمعی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* با *اشریشیا کلی* به ترتیب معادل ۳۱/۵۲ و ۱۶/۹۰ درصد محاسبه شد. بر این اساس، قابلیت تجمعی *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* نسبت یه *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در برابر *اشریشیا کلی* به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر بود.

- بررسی همولیز خون در جدایه‌های لاکتیکی

ارزیابی قابلیت همولیز خون توسط *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* نیز منفی بود و تشکیل هاله‌های روشن یا متمایل به سبز که موید همولیز است، مشاهده نشد.

بحث

- تعیین خواص ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی

Hladikova و همکاران در سال ۲۰۱۲ طی بررسی خاصیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی دریافتند که *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* دارای خاصیت آنتاگونیستی بر روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کلی*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. ویژگی بازدارندگی *پدیوکوکوس* در برابر این میکروارگانیسم‌ها را می‌توان در درجه نخست به تولید اسیدهای آلی و علاوه بر این، تولید برخی از پپتیدهای ضد میکروبی شناخته شده نظیر باکتریوسین‌ها نسبت داد. Ogunbanwo و همکاران در سال ۲۰۰۳ فعالیت ضد

میکروبی و تولید باکتریوسین‌ها را توسط لاکتوباسیلوس‌ها مورد بررسی قرار دادند. این محققین با استفاده از روش انتشار چاهک نشان دادند که لاکتوباسیل‌ها از جمله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از رشد *اشریشیا کلی* (۶-۸ میلی‌متر هاله عدم رشد) و *باسیلوس سرئوس* (۸-۱۰میلی‌مترهاله عدم رشد) جلوگیری می‌کنند. در پژوهش Angmo و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش شد که یک گونه از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده، دارای واضح‌ترین هاله عدم رشد با بیش از ۵ میلی‌متر ممانعت‌کنندگی در برابر *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شیگلا دیسانتری* بوده و جدایه دیگری از جنس *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ممانعت‌کنندگی ضعیفی در برابر *اشریشیا کلی* از خود نشان داد. همچنین هیچ یک از جدایه‌ها فعالیت ضد میکروبی در برابر سودوموناس نداشتند ولی نتایج پژوهش حاضر، حاکی از فعالیت ضد میکروبی جدایه-های لاکتیکی در برابر *سودوموناس پوتیدا* بود. Papamanoli و همکاران (۲۰۰۳) هاله عدم رشد *لیستریا مونوسیتوژنز* در برابر باکتری‌های اسید لاکتیک مورد مطالعه را ۲ تا ۱۰ میلی‌متر گزارش کردند که نزدیک به نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. همچنین در بین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نوعی پنیر توسط Belicova و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیشترین تاثیر در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* با ۸۲ درصد بازدارندگی گزارش گردید. در مطالعات زیادی، تولید اسیدهای آلی نظیر لاکتیک و استیک، تولید متابولیت-های ضد میکروبی و همچنین اثر متقابل اسیدهای آلی با سایر متابولیت‌های ضد میکروبی، عامل اصلی فعالیت ضد میکروبی در باکتری‌های اسید لاکتیک گزارش شده است (Zhang et al, 2011; Essid et al, 2009).

- فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه‌های لاکتیکی

Sadeghi و همکاران (۲۰۱۶) برای تهیه پالیده کشت از انتهای فاز لگاریتمی و ابتدای فاز سکون *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در فواصل زمانی ۸ و ۱۲ ساعت نمونه برداری کردند. lee و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز منحنی رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط کشت ام.آر.اس براث در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را ترسیم کرده و مشاهده نمودند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* پس از ۹ ساعت به انتهای فاز لگاریتمی خود رسید. قاعدتا میکروارگانیسم‌های مختلف، دارای منحنی رشد متفاوتی بوده و برای دستیابی به متابولیت‌های تولیدی در فازهای رشد لگاریتمی و سکون باید منحنی رشد آنها ترسیم گردد.

- خاصیت ضد باکتریایی پالیده کشت جدایه‌های لاکتیکی

در پژوهش حاضر، خاصیت ضد باکتریایی جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج و پالیده حاصل از کشت آن‌ها در برابر عوامل بیماری‌زای مورد مطالعه تایید گردید. همچنین در هر دو روش ارزیابی خاصیت ضد میکروبی، بیشترین بازدارندگی در برابر *لیستریا مونوسیتوژنز* دیده شد که توانایی بالای جدایه‌های لاکتیکی در برابر این باکتری بیماری‌زا را نشان می‌دهد. باکتری‌های پروبیوتیک برای تاثیرگذاری بر فلور میکروبی ناخواسته دستگاه گوارش باید توانایی مقابله و همچنین رقابت با آن‌ها را داشته - باشند. متابولیت‌هایی با وزن مولکولی پایین و برخی از متابولیت‌های ثانویه در مهار باکتری‌های بیماری‌زایی مانند *اشریشیا کلی* موثرند. باکتریوسین‌ها نیز از متابولیت‌های اولیه بوده که در انتهای فاز لگاریتمی و در بعضی از موارد تا ابتدای فاز سکون تولید می‌شوند. به طور کلی به نظر می‌رسد که خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک در فاز رشد لگاریتمی آن‌ها مشهودتر باشد (Simsek et al, 2006; Saarela et al, 2000). ممانعت از فعالیت عوامل بیماری‌زا توسط جدایه‌های لاکتیکی می‌تواند نقش مهمی در مقابله با عفونت‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای شایع دستگاه

گوارش انسان داشته باشد. پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی که عمدتا شامل ترشح مواد ضد میکروبی و اثرات آنتاگونیستی با عوامل بیماری‌زا در اتصال به جایگاه‌ها و استقرار در سطوح مخاطی روده است به رقابت در کسب مواد غذایی و تکثیر با آنها می‌پردازند (Leroy and De Vuyst, 2004). نتایج تحقیقات Tabatabaei Yazdi و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک نشان داد که پالیده فاقد سلول *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سوبتیلیس* دارای خاصیت ضد میکروبی بود. Cizeikiene و همکاران (۲۰۱۳) نیز با بررسی خاصیت ضد میکروبی متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک دریافتند که پالیده کشت *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* و *پدیوکوکوس اسیدی-لاکتیس* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلی* خاصیت بازدارندگی داشتند. در مطالعه Nghe and Nguyen (۲۰۱۴) نیز بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* در انتهای فاز رشد لگاریتمی آن مشاهده شد که معادل با اثر ضد میکروبی سفالوسپورین بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بود. اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پراکسید هیدروژن، روتروسایکلین، پپتیدهای ضد قارچی، باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی از مهم‌ترین عوامل ضد میکروبی باکتری-های اسید لاکتیک به شمار می‌آیند (Tejero-Sarinena et al, 2012). میزان بازدارندگی هر باکتری اسید لاکتیک نیز بسته به سویه آن، مقدار و نوع متابولیت‌های ضد میکروبی تولیدی، نوع و جمعیت عامل بیماری‌زا و همچنین شرایط گرمخانه‌گذاری و حتی ترکیبات ماتریکس غذایی متفاوت است (Sadeghi et al, 2016).

- بررسی تحمل جدایه‌های لاکتیکی به اسید و صفرا

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که زنده‌مانی جدایه‌های لاکتیکی در pH =۳ بیشتر از pH =۲ بود و *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* از زنده‌مانی بیشتری در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش برخوردار بود. مهم‌ترین معیارهای انتخابی باکتری‌های پروبیوتیک، مقاومت به شرایط اسیدی، نمک صفراوی، فعالیت ضد میکروبی علیه عوامل بیماری‌زا، داشتن الگوی مناسب مقاومت به آنتی‌بیوتیک، عدم همولیز خون و توانایی اتصال و رقابت با عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Fernandez et al, 2003). یکی از فاکتورهای اثر بخشی این میکروارگانیسم‌ها عبور از موانع فیزیکی و شیمیایی مانند اسید و صفرای موجود در دستگاه گوارش است. اخیرا، غلظت ۰/۳ درصد صفرا برای ارزیابی توانایی پروبیوتیک‌ها به تحمل صفرا در نظر گرفته شده است (Mathara et al, 2008). همچنین طبق گزارش Sahadeva و همکاران، اسیدهایی مانند هیدروکلریدریک که در معده انسان نیز یافت می‌شود، به شدت اکسید کننده بوده و باعث از بین رفتن مولکول‌های زیستی مانند اسیدهای چرب، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. همچنین کاهش pH محیط می‌تواند باعث مهار متابولیسم و کاهش رشد و زنده‌مانی باکتری‌های اسید لاکتیک گردد (Sahadeva et al, 2011). مقاومت بالای بعضی از باکتری‌ها به pH پایین را می‌توان به تولید ترکیباتی مانند اگزو پلی ساکاریدها نسبت داد که از اثر اسید بر روی غشای سلولی آن‌ها ممانعت می‌کند (Vinderola and Reinheimer, 2003). Jensen و همکاران (۲۰۱۲) نیز بیان کردند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از خمیرترش در شرایط شبیه‌سازی شده روده کوچک، میزان زنده‌مانی بیشتری نسبت به شرایط شبیه‌سازی شده معده داشته و میزان زنده‌مانی آن با گذشت زمان کاهش یافت. باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده در پژوهش Angmo و همکاران در سال ۲۰۱۶ (به جز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) در ۱ درصد نمک صفراوی با

کاهش زنده‌مانی مواجه شدند. همچنین در پژوهش مذکور، میزان زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط pH =۲ کمتر از pH =۳ گزارش شده است. در مطالعات بسیاری نیز مشخص گردیده که میزان بقای باکتری‌های اسید لاکتیک در pHهای ۴-۲/۵ تحت تاثیر قرار نگرفته اما در pHهای پایین‌تر کاهش یافته است (Wang et al, 2010; Mishra and Prasad, 2005). توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک برای زنده-مانی در محیطی با اسیدیته بالا (محیط شبیه‌سازی شده معده) بسته به سویه مورد مطالعه، متغیر گزارش شده که البته برای پروبیوتیک‌ها دارای اهمیت است (Fernandez et al, 2004; Pennacchia et al, 2004). lee و همکاران (۲۰۱۶) با ترسیم منحنی رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در شرایط اسیدیته مختلف دریافتند که رشد این باکتری‌ها با کاهش اسیدیته کاهش می‌یابد و در pH معادل ۲ به کمترین میزان خود می‌رسد. این محققین همچنین نشان دادند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از کیمچی دارای مقاومت قابل توجهی در اسیدیته پایین و نمک‌های صفراوی ۰/۳ درصد بود. در پژوهش Papamanoli و همکاران (۲۰۰۳) نیز ۵۸ درصد زنده‌مانی *لاکتوباسیلوس کورواتوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در حضور ۰/۳درصد صفرا گزارش شد.

- الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک

امروزه الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به عنوان یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های پروبیوتیک مطرح می‌باشد. اگرچه باکتری‌های اسید لاکتیک، تاریخچه‌ای طولانی در تولید مواد غذایی و نوشیدنی‌های تخمیری دارند اما اخیرا گزارش شده که باکتری‌های مورد استفاده به عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه در فرآوری این محصولات ممکن است دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک بوده و این مقاومت آنتی‌بیوتیکی را به باکتری‌های هم خانواده و یا بیماری‌زا منتقل نمایند. به طور کلی مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک توسط مکانیسم‌های بیوشیمیایی اختصاصی کنترل می‌گردد که توسط ژن‌های پلاسمیدی یا اپی‌زومی مقاومت به آنتی‌بیوتیک کد شده و در بین میکروارگانیسم‌ها قابل انتقال می‌باشد. خطر انتقال این ژن‌ها به ماهیت مواد ژنتیکی (پلاسمید و انتقال‌دهنده‌ها[1])، اجزاء تسهیل کننده انتقال نظیر پیلی، قابلیت‌های سلول پذیرنده برای کسب این ویژگی و همچنین شرایط محیطی بستگی دارد (Makras et al, 2006). بر اساس نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در پژوهش Angmo و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیشتر جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، کلیندامایسین، کوتریماکسازول، اریترومایسین و آمپی-سیلین (به جز ونکومایسین) حساس بودند. همچنین جدایه‌های لاکتیکی مطالعه شده در پژوهش lee و همکاران (۲۰۱۶) به جز ونکومایسین نسبت به آنتی-بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، اریترومایسین، کلرامفنیکل و سیکلوهگزامید حساسیت داشتند. همچنین ۲۶/۶ درصد مقاومت به پنی‌سیلین و ۶۰ درصد مقاومت به سیپروفلاکساسین در لاکتوباسیل‌ها گزارش شد. اما در مطالعه حاضر، علاوه بر مقاومت به ونکومایسین، مقاومت در برابر استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید، سیپروفلاکساسین و جنتامایسین نیز مشاهده گردید. مقاومت پروبیوتیک‌ها به ونکومایسین به واسطه عملکرد ویژه این آنتی‌بیوتیک در برابر عفونت‌های حاد ناشی از عوامل بیماری‌زای مقاوم به داروهای ترکیبی حائز اهمیت است (Hummel et al, 2007). Hummel و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۴۵ باکتری اسید لاکتیک و بررسی ژن مقاومت در آن‌ها بیان کردند که مقاومت ذاتی به سیپروفلاکساسین و آمینوگلیکوزیدها (جنتامایسین و استرپتومایسین) بیشتر از ۷۰ درصد بوده که مقاومت به این آنتی-

1. Transposons

بیوتیک‌ها توسط هر دو جدایه لاکتیکی در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد. همچنین بر اساس نتایج پژوهش حاضر، مقاومت به سفازولین، پنی‌سیلین، سفتریاکسون و کلیندامایسین در این دو جدایه لاکتیکی متغیر بود که در گزارش Hummel و همکاران (۲۰۰۷) نیز متغیر بودن مقاومت کشت‌های آغازگر در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند پنی‌سیلین مطرح شده ولی با این حال، هیچ ژن مقاومتی در آن‌ها شناسایی و گزارش نگردیده است. محققین مذکور همچنین مقاومت به پنی‌سیلین در دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را گزارش نمودند که *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* جدا شده در پژوهش حاضر نیز به پنی‌سیلین مقاوم بود.

- خاصیت تجمعی جدایه لاکتیکی با *اشریشیا کلی*

جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی در مطالعه حاضر، دارای قابلیت اتصال با *اشریشیا کلی* بودند. قابلیت اتصال در باکتری‌ها به دو صورت خود اتصالی[1] (اتصال سویه‌های باکتریایی هم نوع) و دگر اتصالی[2] (اتصال سویه‌های باکتریایی متفاوت) بررسی می‌گردد. اتصال سویه‌های باکتریایی هم نوع، عموما موجب اتصال آنها به سلول‌های اپی‌تلیال روده، لانه‌گزینی و محافظت از دستگاه گوارش می‌شود. اتصال سویه‌های باکتریایی متفاوت نیز منجر به واکنش سویه‌ها با عوامل بیماری‌زا و ممانعت از لانه‌گزینی آنها در دستگاه گوارش می‌گردد. بنابراین باکتری‌های اسید لاکتیک از طریق رقابت برای تصاحب جایگاه اتصال سلول‌های اپی‌تلیال روده، کاهش لانه‌گزینی عوامل بیماری‌زا و ممانعت از ایجاد عفونت توسط آنها می‌توانند از اثر باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (Jankovic et al, 2012). Collado و Meriluoto در سال ۲۰۰۸ میزان قابلیت خود اتصالی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را پس از دو ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲۱/۷ درصد و میزان قابلیت دگر اتصالی آن را با *استافیلوکوکوس اورئوس* پس از ۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، ۲۲/۹ درصد گزارش کردند. همچنین دریافتند که میزان تجمع خود اتصالی در سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی با افزایش زمان گرمخانه‌گذاری، افزایش یافته و این افزایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. طبق گزارشات Angmo و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز از بین باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده، بیشترین خاصیت تجمعی را *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با ۷۳ درصد دارا بود. بین میزان آبگریزی دیواره سلولی و قابلیت تجمع باکتری‌های اسید لاکتیک بر ضد باکتری‌های بیماری‌زا و نهایتاً گزینش باکتری‌های پروبیوتیک برای مصارف انسانی رابطه مستقیمی گزارش شده است (Collado et al, 2007).

- همولیز خون

در مطالعه حاضر، فعالیت همولیزی در جدایه‌های لاکتیکی مشاهده نشد. طبق بررسی Angmo و همکاران در سال ۲۰۱۶ نتیجه همولیز خون همه جدایه‌ها لاکتیکی، منفی گزارش شد. جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* مطالعه شده توسط Kalui و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز فاقد فعالیت همولیزی بودند. ایمنی مصرف به عنوان یکی از ویژگی‌های ارزیابی پروبیوتیک‌ها در سال ۲۰۰۲ توسط FAO/WHO مطرح شده که به جز ارزیابی‌های *in vivo*، آزمون همولیز نیز در این خصوص اهمیت دارد. از آنجا که فعالیت همولیزی باکتری‌ها می‌تواند لایه‌های اپی‌تلیال روده را دچار اختلال کند لذا فقدان فعالیت همولیزی در آنها برای مصارف انسانی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است (Angmo et al, 2016).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج پژوهش حاضر، *لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* جدا شده از خمیرترش‌های سبوس گندم و سبوس برنج از قابلیت

1. Auto-aggregation
2. Co-aggregation

مناسبی برای استفاده به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک جهت تامین کشت آغازگر و یا کشت همراه در فرآوری محصولات تخمیری برخوردارند. جدایه‌های مذکور، علاوه بر زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش، از خاصیت ضد میکروبی مناسبی در برابر باکتری‌های شاخص مورد مطالعه برخوردار بوده و به واسطه قابلیت تجمعی بر ضد *اشریشیا کلی* می‌توانند به شکل موثری ضمن جلوگیری از تجمع آن در روده از دسترسی این عامل عفونی به مواد غذایی نیز ممانعت نمایند.

منابع

1. Angmo, K., Kumari, A., Savitri, D., A.K., and Bhalla, T.C. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT- Food Sci Technol. 66: 428-435.
2. Belicova, A., Mikulasova, M., and Dusinsky, R. 2013. Probiotic potential and safety properties of *lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. Bio Med Res Int. doi: 10.1155/2013/760298
3. Bories, G., Brantom, P., Brufau, J., and De knecht, J. 2008. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. Eur Food Safe Auto. 732: 1-15.
4. Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskericius, A., and Bartkiene, E. 2013. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control. 31: 539-545.
5. Collado, M.C., Meriluoto, J., and Salminen, S. 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur Food Res Technol. 226: 1065-1073.
6. 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.
7. De Vuyst, L., and Vancanneyt, M. 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiol, 24: 120-127.
8. Ehsanbakhsh, M., Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M. and Kashaninejad, M. 2017. Isolation, molecular identification and evaluation of antifungal effect of dominant lactic acid bacteria isolated from wheat bran and rice bran sourdoughs. J Res Innov Food Sci Technol. in press [in Persian].
9. Essid, I., Medini, M., and Hassouna, M. 2009. Technological and safety properties of *lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. Meat Sci. 81: 203-208.
10. Fernandez, M.F, 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.
11. Gulahmadov, S.G., Abdullaeva, N.F., Guseinova, N.F., Kuliev, A.A., Ivanova, I.V., Dalgalarondo, M., Chobbert, J.M., and Haertlee, T. 2009. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. Appl Biochem Microb. 45: 266-271.

12. Herreros, M.A., Sandoval, H., González, L., Castro, J.M., Fresno, J.M., and Tornadijo, M.E. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). Food Microbiol. 22: 455-459.
13. Hladíkova, Z., Smetankova, J., Greif, G., and Greifova, M. 2012. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. Acta Chimica Slovenica. 5: 80-85.
14. 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 Microb. 73: 730-739.
15. Jankovic, T., Frece, J., Abram, M., and Gobin, I. 2012. Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Int J Sci Eng Res. 6: 19-24.
16. Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K., and Axelsson, L. 2012. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol. 153: 216-222.
17. Jorgensen, J., and Ferraro, M. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infect Dis. 49: 1749-1755.
18. Kalui, C.M., Mathara, J.M., and Kutima, P.M. 2010. Probiotic potential of spontaneously fermented cereal based foods – A review. Afr J Biotechnol. 9: 2490-2498.
19. Lee, K.W., Shim, J.M., Park, S.K., Heo, H.J., Kim, H.J., Ham, K.S., and Kim, J.H. 2016. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. LWT-Food Sci Technol. 71: 130-137.
20. Leroy, F., and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Tech. 15: 67-78.
21. Liu, X., Liu, W., Zhang, Q., Tian, F., Wang, G., Zhang, H., and Chen, W. 2013. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. Food Control. 30: 563-568.
22. Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., and De Vuyst, L. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella ente*rica* serovar *typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res Microbiol. 157: 241-247.
23. 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.
24. Marthara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz, C., and Holzapfel, W.H. 2008. Functional properties of *lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. Curr Microbiol. 56: 315-321.
25. Mirsha,V., and Prasad, D.N. 2005. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. Int J Food Microbiol. 103: 109-115.
26. Mojgani, N., Torshizi, M.A.K., and Rahimi, S. 2007. Screening of locally isolated lactic acid bacteria for use as probiotics in poultry in Iran. J Poult Sci. 44: 357-365.

functional and technological properties. J Biotech. 84: 197-215.

35. Sadeghi, A., and Ebrahimi, M. 2016. Isolation, molecular identification and evaluation of the probiotic properties of dominant Lactobacillus in whole wheat sourdough. J Microb World. 9: 133-144 [in Persian].
36. Sadeghi, A., Raeisi, M., Ebrahimi, M., and Sadeghi, B. 2016. Antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from whole barley sourdough. J Food Quality Hazards Control. 3: 30-36.
37. Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W., and Chan, H.K. 2011. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. Int Food Res J. 18: 1515-1522.
38. Simsek, O., Con, A.H., and Lu, S.T. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control. 17: 263-270.
39. Tabatabaei Yazdi, F., Vasiee, A.R., Alizadeh Behbahani, B., and Mortazavi, S.A. 2015. Diversity of lactic acid bacteria communities in “Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds. Iranian J Food Sci Technol. 13: 1-14 [in Persian].
40. Tamime, A.Y. 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications-a review. Eur J Clin Nutr. 56: S2-S15.
41. Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G.R., and Rowland, I. 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. Anaerobe. 18: 530-538.
27. Nghe, D., and Nguyen, T. 2014. Characterization of antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* Vtcc-B-601. J Appl Pharm Sci. 4: 061-064.
28. Ogunbanwo, S., Sanni, A., and Onilude, A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr J Biotechnol. 2: 219-227.
29. Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat sci. 65: 859-67.
30. Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., and Villani, F. 2004. Selection of lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. Meat Sci. 67: 309-317.
31. Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., and Matuchansky, C. 2005. Bifidobacteria as probiotic agents–physiological effects and clinical benefits. Aliment Pharmacol Ther.. 22: 495-512.
32. Purohit, S., Sharma, R., Jodhawat, N., and Kaur, S. 2012. Evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus ferementum* strain. Int J Pharm Sci Rev Res. 14: 142-144.
33. 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.
34. Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety,

barrier resistance. Food Res Int. 36: 895-904.

45. Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H., and Qi, W. 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. Plos One. 7: e29452 .
46. 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.
42. Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I., and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. Int J Food Microbiol. 48: 167-177.
43. Tripathi, M.K., and Giri, S.K. 2014. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. J Funct Food. 9: 225-241.
44. Vinderola, C.G., and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological

Evaluation of antibacterial and probiotic properties of *Lactobacillus paraplantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran and rice bran sourdoughs

Ehsanbakhsh M[1], Sadeghi A[1*], Raeisi M[2], Ebrahimi M[2], Kashaninejad M[1]

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

2. Cereal Health Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

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

Received: 7 July 2017 Accepted: 23 August 2017

Abstract

The aims of this study were to evaluate the probiotic and antibacterial properties of *Lactobacillus paraplantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran and rice bran sourdoughs. For mentioned purpose, survival of the isolates in simulated conditions of gastrointestinal tract, their antagonistic activity against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida* as foodborne indicator bacteria, ability of aggregation with *E. coli* as an infection agent of intestine and profile resistance of these lactic acid bacteria (LAB) isolates against some of routine antibiotics and their hemolysis activity were also investigated. Based on the results, the highest sensitivity of the bacterial indicators towards LAB isolates was observed in *L. monocytogenes*. Furthermore, the highest inhibition of LAB cell-free culture filtrate (CCF) were belonged to *L. paraplantarum* logarithmic and stationary CCF, against *L. monocytogenes* and *P. pentosaceus* stationary CCF, against *P. putida*. The survival of *L. paraplantarum* was also significantly ($P<0.05$) more than the other LAB isolate in pH=3 and 0.3% bile salt. Furthermore, the LAB isolates were resistant to Vancomycin, Sterptomycin, Nalidixic Acid, Ciprofloxacin and Gentamycin antibiotics. Aggregation ability of *L. paraplantarum* and *P. pentosaceus* with *E. coli* were respectively equal to 31.52 and 16.9% and the LAB isolates hadn't hemolysis activity.

Keywords: LAB isolate, Probiotic properties, Antibacterial effect, Wheat bran and rice bran sourdoughs