ارزیابی قابلیت لاکتوباسیلوس‌های غالب جدا شده از خمیرترش آرد کامل گندم در کاهش میزان آفلاتوکسین B_1

علیرضا صادقی*[1]، مریم ابراهیمی[2]، مجتبی رئیسی[3]

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

۲. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳. مرکز تحقیقات سلامت غلات، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، ایران.

نویسنده مسئول*: sadeghi.gau@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰

چکیده

هدف از این مطالعه، ارزیابی مقدار آفلاتوکسین B_1 و رشد *آسپرژیلوس فلاووس* تحت تأثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* جدا شده از خمیرترش آرد کامل گندم بود. پس از تأیید شناسایی جدایه‌های لاکتیکی مذکور با استفاده از PCR دارای پرایمر اختصاصی، تأثیر این جدایه‌ها بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و توانایی آنها در کاهش آفلاتوکسین B_1 با کمک آزمون الایزای رقابتی مستقیم مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تأثیر زمان گرمخانه‌گذاری (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت) و تیمار حرارتی (اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه) بر میزان باقیمانده آفلاتوکسین B_1 در حضور جدایه‌های لاکتیکی نیز ارزیابی شد. در پایان دوره شش روزه بررسی تأثیر جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس*، قطر کلنی کپک مذکور در حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس سیکی* و نمونه کنترل به ترتیب ۱/۸۷، ۶/۵ و ۹ سانتی‌متر بود. همچنین درصد باقیمانده آفلاتوکسین B_1 پس از گرمخانه‌گذاری در حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۶۳/۶۰، ۵۰/۲۸ و ۴۵/۳۴ و در حضور *لاکتوباسیلوس سیکی* به ترتیب ۷۳/۵۵، ۷۱/۷۰ و ۶۳/۱۷ بود. علاوه بر این، سلول غیر زنده (اتوکلاو شده) این جدایه‌ها در مقایسه با سلول زنده آنها به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) توانست آفلاتوکسین B_1 را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: الایزای رقابتی مستقیم، PCR دارای پرایمر اختصاصی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس سیکی*، *آسپرژیلوس فلاووس*.

مقدمه

قارچ‌ها شایع‌ترین عوامل میکروبی مولّد فساد در حین نگهداری فرآورده‌های غذایی محسوب می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها ضمن وارد کردن خسارت اقتصادی جبران ناپذیر، به واسطه تولید اسپور و انواع مایکوتوکسین، تهدیدی جدّی برای سلامت مصرف کنندگان این محصولات نیز به شمار می‌آیند (Magnusson et al., 2003). آفلاتوکسین‌ها جزء متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که توسط برخی از گونه‌های جنس *آسپرژیلوس* (*فلاووس*، *پارازیتیکوس* و *نومیوس*) تولید گردیده و بر اساس طبقه‌بندی آژانس بین-المللی تحقیقات سرطان در گروه نخست ترکیبات سرطانزا

قرار می‌گیرند. آفلاتوکسین B_1[1] (AFB_1)، سمی‌ترین نوع آفلاتوکسین و از قوی‌ترین مواد سرطانزای کبدی محسوب می‌گردد که تا به امروز شناخته شده است (Hernandez-Mendoza et al., 2011). مشکلات اقتصادی ناشی از افت محصولات کشاورزی و یا کاهش راندمان تولید فرآورده‌های دامی در کنار مخاطراتی که آفلاتوکسین‌ها در سلامت مصرف کنندگان مواد غذایی آلوده ایجاد می‌کنند باعث گردیده تا مطالعات فراوانی به منظور ارائه یک روش کارآمد برای کنترل آلودگی به این سموم قارچی صورت گیرد. متأسفانه نمی‌توان آفلاتوکسین‌ها را به طور کامل از سیستم‌های آلوده حذف نمود و عموما" روش‌های موجود صرفا جهت کاهش میزان این ترکیبات به یک آستانه قابل قبول مورد استفاده قرار می‌گیرند. بر این اساس، راه حل ایده‌آل برای محدود ساختن خطر مواجهه با این مایکوتوکسین‌ها، ممانعت از آلودگی مواد غذایی یا خوراک دام به آنهاست. استفاده از مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک با قابلیت جذب و متابولیسم انواع آفلاتوکسین، مؤثرترین روش زیستی جهت کاهش میزان این مایکوتوکسین‌ها و جلوگیری از انتقال آنها به دستگاه گوارش انسان و یا حیوانات محسوب می‌شود (Wu et al., 2009). باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید اسیدهای آلی و یا متابولیت‌های دیگری همچون اسید فنیل لاکتیک، اسید ۴ هیدروکسی فنیل لاکتیک و برخی از ترکیبات شبه - باکتریوسینی از قابلیت بالایی برای کنترل رشد قارچ‌ها و محدود ساختن تولید سموم قارچی برخوردارند. مطالعات متعددی به منظور بررسی قابلیت میکروارگانیسم‌ها خصوصا" باکتری‌های اسید لاکتیک برای کاهش میزان AFB_1 صورت گرفته است. این باکتری‌ها بسته به جنس، گونه و نژاد با اتصال به آفلاتوکسین قادرند میزان آن را در مایع گوارشی نیز کاهش دهند (Hernandez-Mendoza et al., 2011). کلرتی و همکاران (۲۰۰۷) با بررسی تاثیر ضد قارچی ۶۵ سویه *لاکتوباسیلوس* جدا شده از سالامی در فازهای رشد فعال و غیر فعال دریافتند که صرفا" ۱۰ باکتری از بین جدایه‌های مورد مطالعه در فاز رشد فعال خود به واسطه تولید متابولیت-هایی نظیر فنیل لاکتات و هیدروکسی فنیل لاکتات در مقابل *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* دارای اثر ضد قارچی بودند در حالی که تمامی این جدایه‌ها در فاز رشد غیر فعال و پس از هیدرولیز به واسطه تولید ترکیبات پپتیدی این ویژگی را بروز دادند (Coloretti et al., 2007). براساس نتایج کرستی و همکاران (۱۹۹۸)، باکتری‌های اسید لاکتیک هترو فرمنتاتیو اجباری موجود در خمیرترش از خواص ضد قارچی بیشتری در برابر عوامل کپک‌زدگی نان نظیر *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم*، *فوزاریوم* و *مونیلیا* برخوردارند. همچنین اسیدهای آلی تولید شده توسط این باکتری‌ها دارای اثر سینرژیستی بر خواص ضد قارچی آنها بوده و اسید کاپروئیک در *لاکتوباسیلوس سانفرانسیس* در محدود ساختن رشد قارچ‌ها نقش کلیدی دارد (Corsetti et al., 1998). زین‌الدین و همکاران (۲۰۰۵)، تاثیر باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از نان خمیرترشی مراکش را بر کاهش میزان AFB_1 مورد ارزیابی قرار دادند. براساس نتایج این محققین، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* در مقایسه با گونه‌های *پدیوکوکوس* و *لویکونوستوک* از توانایی بیشتری برای کاهش میزان آفلاتوکسین برخوردار بودند (Zinedine et al., 2005). فاضلی و همکاران (۲۰۰۴) نیز توانستند از خمیرترش سنتّی ایران، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* را با خاصیت کاهش کپک-زدگی جدا نمایند (Fazeli et al., 2004). همچنین مرتضوی و صادقی (۲۰۱۱) در ارزیابی خاصیت ضد میکروبی خمیرترش سنّتی نان لواش دریافتند که با کنترل شرایط

[1] - Aflatoxin B1

تخمیر نظیر دما و زمان می‌توان به شکل مؤثری جمعیت *باسیلوس سوبتیلیس* (مهم‌ترین عامل مولد روپینس) و *نوروسپورا سیتوفیلا* (یکی از مهم‌ترین عوامل کپک‌زدگی نان) را کنترل نمود (Mortazavi and Sadeghi, 2011).

با توجه به توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در کنترل رشد سویه‌های قارچی و کاهش میزان آفلاتوکسین، این مطالعه با هدف تعیین قابلیت برخی از آغازگرهای لاکتیکی خمیرترش آرد کامل گندم در محدود ساختن رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و ممانعت از تولید AFB_1 به عنوان یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌های سرطانزا به اجرا در آمد.

مواد و روش‌کار

مطالعه حاضر از زمستان ۱۳۹۳ تا تابستان ۱۳۹۴ در معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی گلستان و دانشکده صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام پذیرفت. در این مطالعه، ابتدا تک پرگنه‌خالص جدایه‌های لاکتیکی از کشت خطی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش آرد کامل گندم در محیط کشت اختصاصی MRS Agar (مرک، آلمان) به دست آمد. پس از شناسایی اولیه جدایه‌های مورد نظر با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژی نظیر آزمون کاتالاز و رنگ آمیزی گرم، DNA تک‌پرگنه آنها، استخراج (بیونیر، AccuPrep K-3032، کره جنوبی) و توسط PCR دارای پرایمر اختصاصی، تکثیر (Ferchichi et al., 2007) و متعاقبا محصولات PCR، توالی‌یابی (MWG، آلمان) شد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون 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
باکتری‌های اسید لاکتیک	F: GAACGCGAAGAACCTTAC R: GCGTGTGTACAAGACCC	۵۰۰ جفت باز	Ferchichi et al., 2007

واکنش PCR نیز در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، شامل یک واحد بافر استاندارد PCR، ۲۵ پیکومول از هر پرایمر، مخلوطی از هر dNTP با غلظت ۰/۲میلی‌مولار، ۲۵ میکرو گرم سرم آلبومین، Taq پلیمراز با فعالیت ۲/۵ واحد (روبوست، فرانسه) و ۲ میکرولیتر از DNA با غلظت ۱۰۰ نانوگرم انجام شد. سپس در مرحله اول تکثیر، واسرشت DNA با شروع داغ در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه آغاز گشته و طی ۳۵ چرخه با برنامه حرارتی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. سرانجام مرحله تکثیر انتهایی نیز به مدت ۷ دقیقه در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد (ترموسایکلر کوربت، مدل CG1-96، استرالیا) خاتمه پیدا کرد (Ferchichi et al., 2007). در بخش دیگر این پژوهش، جدایه‌های شناسایی شده در محیط MRS broth، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. سپس باکتری‌ها به کمک سانتریفوژ یخچال‌دار در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردیده و پس از حذف سوپرناتانت در سرم فیزیولوژی حل شدند. عمل شستشو سه بار تکرار گردید و نهایتا میزان جذب سرم حاوی باکتری به کمک اسپکتروفتومتر در دانسیته نوری ۶۰۰ نانومتر، اندازه‌گیری و تعداد باکتری در مقادیر مشخص تنظیم

گردید. *آسپرژیلوس فلاووس* (PTCC ۵۰۰۴) نیز پس از کشت بر روی محیط PDA[۱] به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. در مرحله بعد، اسپورها از سطح پلیت جمع‌آوری و در بافر فسفات سالین با pH=۷ به صورت سوسپانسیون درآورده شد و نهایتاً به کمک لام هموسایتومتر، تعداد اسپور در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون به $۱۰^۶$ تنظیم گردید (Tropcheva et al., 2014).

به منظور ارزیابی تأثیر جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس*، یک درصد از سلول‌های شسته شده هر کدام از جدایه‌های لاکتوباسیلوس ($۱۰^۸$ کلنی در هر میلی لیتر) به محیط کشت MRS broth تلقیح گردید و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس محیط کشت مذکور با محیط کشت PDA (۴۵ درجه سانتی‌گراد) در حجم‌های مساوی، مخلوط و در پلیت ریخته شد. نمونه کنترل، شامل پلیت‌های آگاردار حاوی محیط کشت MRS broth و فاقد باکتری لاکتیکی بود. پس از انعقاد محیط کشت، ۳ میکرو لیتر از اسپور قارچ به صورت نقطه‌ای بر روی سطح و در قسمت مرکزی پلیت گذاشته شد. سپس پلیت‌ها در شرایط هوازی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و به صورت روزانه، قطر رشد کلنی کپک در آنها تا زمانی که کپک در نمونه کنترل به طور کامل سطح پلیت را پوشاند، اندازه‌گیری گردید (Tropcheva et al., 2014).

برای بررسی توانایی جدایه‌های لاکتیکی در جذب AFB_1، این مایکوتوکسین از شرکت سیگما (Sigma 6636) به صورت ویال یک گرمی حاوی پودر توکسین خریداری شد. سپس با افزودن به محلول بنزن و استونیتریل (مرک، آلمان) به نسبت ۹۷:۳و تبخیر حلال در بن‌ماری، در بافر فسفات با pH=۷ حل گردید. در ادامه به هر میلی‌لیتر از ویال‌های حاوی توکسین، جمعیت مشخصی از سویه باکتریایی مورد نظر افزوده شد. سپس ویال‌ها در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گرمخانه‌گذاری، محلول بافر فسفات حاوی سویه باکتری و آفلاتوکسین به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید تا سلول باکتری جدا گردد. سپس میزان AFB_1 محلول فوقانی با روش الایزای رقابتی مستقیم (واکنش رقابتی بین آنتی‌ژن نمونه با آنتی‌ژن نشان‌دار شده در اتصال به آنتی‌بادی اختصاصی) به کمک کیت الایزای خریداری شده از شرک روکت اینترنشنال (آلمان)، اندازه‌گیری و با نمونه کنترل (فاقد باکتری و حاوی همان مقدار آفلاتوکسین)، مقایسه گردید (Hernandez-Mendoza et al., 2009). علاوه بر این، جهت بررسی توانایی سلول‌های غیر زنده در کاهش میزان AFB_1، از تیمار حرارتی استفاده شد. برای اعمال تیمار حرارتی، پس از برداشت سلول در مرحله رشد لگاریتمی و سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه)، ۱۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات حاوی جمعیت مشخصی از باکتری‌های لاکتیکی تهیه و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه اتوکلاو شد. سپس تأثیر آن بر حذف آفلاتوکسین بررسی گردید (Shetty et al., 2007).

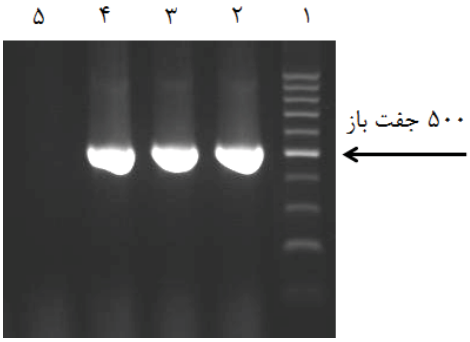
نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آزمون‌های آماری t مستقل و آنالیز واریانس یک طرفه در سطح معنی‌داری $P <۰/۰۵$ با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آنالیز آماری نتایج و رسم نمودارها نیز به ترتیب از نرم افزارهای SAS نسخه ۹/۲ و Microsoft Office Excel استفاده شد. لازم به توضیح است که در تیمارهایی که صرفاً تأثیر زمان گرمخانه‌گذاری در مورد هر کدام از جدایه‌های لاکتیکی به شکل مستقل در بازه‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت بر کاهش آفلاتوکسین مورد ارزیابی قرار گرفته بود و همچنین

[۱] - Potato Dextrose Agar

در تیمارهایی که تأثیر دو جدایه لاکتیکی و نمونه کنترل در هر یک از روزهای اول تا ششم پس از کشت به شکل مستقل بر رشد آسپرژیلوس سنجیده شده بود از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. علاوه بر این، در مورد مقایسه دو جدایه لاکتیکی با یکدیگر به لحاظ قابلیت کاهش آفلاتوکسین در زمان‌های یکسان گرمخانه‌گذاری و همچنین مقایسه بین دو حالت زنده و مرده هر یک از دو جدایه لاکتیکی بر کاهش آفلاتوکسین نیز از آزمون t مستقل استفاده شد.

نتایج

ارزیابی اولیه تکثیر DNA تک پرگنه‌های حاصل از کشت خطی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش با ژل الکتروفورز محصولات تولیدی، تایید گردید (شکل ۱). نتایج توالی‌یابی محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی از DNA این پرگنه-ها نیز پس از مقایسه توالی‌های مذکور با داده‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعاتی NCBI[2] و RDP[3] منجر به شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* شد.



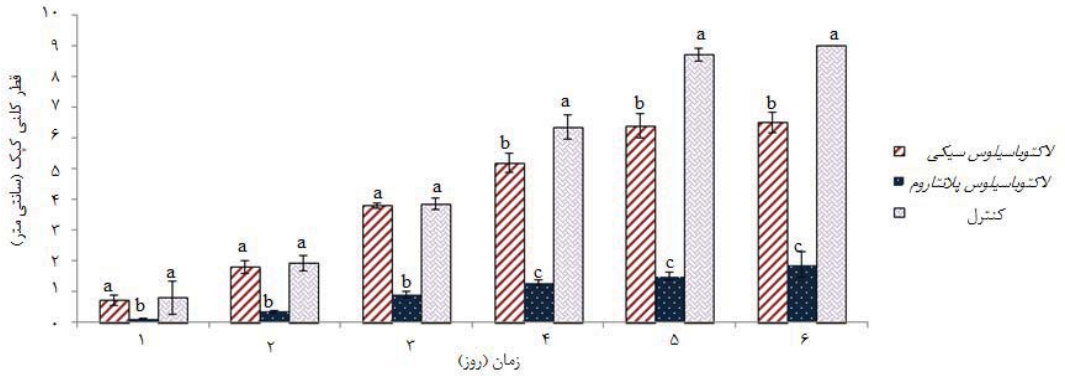
شکل ۱- ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی‌هدف ۵۰۰ جفت باز جهت شناسایی جدایه‌های لاکتیکی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش آرد کامل گندم (لاین ۲ و ۳) در مجاورت مارکر صد جفت بازی (لاین ۱) و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* spp (لاین ۴) و کنترل منفی یا فاقد باکتری (لاین ۵).

نتایج حاصل از تأثیر جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* در نمودار ۱ نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می‌گردد جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس سیکی* از فعالیت بازدارندگی بیشتری علیه *آسپرژیلوس فلاووس* برخوردار بود. آنالیز نتایج نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین قطر کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* در پلیت حاوی جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقایسه با پلیت کنترل و پلیت حاوی *لاکتوباسیلوس سیکی* وجود داشت (P<۰/۰۵).

همچنین بین قطر کلنی کپک در پلیت کنترل با پلیت حاوی *لاکتوباسیلوس سیکی* از روز اول تا روز سوم، اختلاف معنی-داری مشاهده نشد اما طی روزهای چهارم، پنجم و ششم، اختلاف در رشد کپک در این دو پلیت معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). لازم به ذکر است که در پایان دوره بررسی شش روزه، قطر کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس سیکی* و کنترل به ترتیب ۱/۸۷±۰/۴۱، ۶/۵۰±۰/۳۴ و ۹±۰ سانتی‌متر بود.

[2] - National Center for Biotechnology Information

[3] - Ribosomal Database Project



نمودار ۱- تاثیر جدایه‌های لاکتیکی بر رشد *آسپرژیلوس فلاووس* با تعیین قطر کلنی کپک.
حروف مشابه در هر روز، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

در بخش دیگری از این پژوهش، جمعیت مشخصی از جدایه‌های لاکتیکی تهیه و تأثیر آن بر کاهش AFB_1 بررسی شد. سپس میانگین مقادیر جذب آفلاتوکسین مربوط به محلول‌های استاندارد و این نمونه‌ها بر میانگین جذب استاندارد صفر (نمونه فاقد آفلاتوکسین)، تقسیم و در عدد ۱۰۰ ضرب گردید تا نتایج به صورت درصد بیان شود. نتایج به دست آمده (جدول ۲) نشان داد که جمعیت باکتریایی، یکی از عوامل مؤثر در حذف AFB_1 می‌باشد. درصد باقیمانده AFB_1 با افزایش جمعیت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* به ترتیب تا ۲×۱۰^{۹} و ۴×۱۰^{۹} کلنی در هر میلی‌لیتر، روندی نزولی داشت ولی پس از آن، تغییر معنی‌داری در کاهش مقدار AFB_1 مشاهده نشد (P<۰/۰۵).

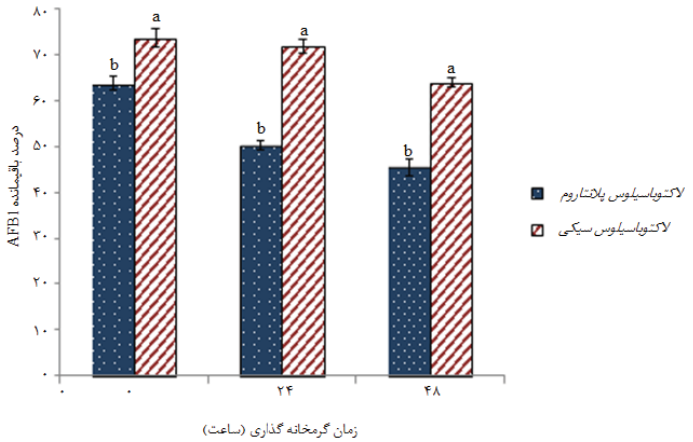
جدول ۲- درصد باقیمانده AFB_1 در حضور جمعیت‌های مختلف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی*

جمعیت ($CFU\times۱۰^{۹}$) / جدایه لاکتیکی	۰/۵	۱	۲	۴	۶
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۸۱/۷۹±۲/۲^{a}	۷۶/۸۳±۱/۳^{b}	۶۳/۶۰±۰/۹۱^{c}	۶۲/۳۰±۱/۸۳^{c}	۶۰/۷۱±۱/۵۵^{c}
لاکتوباسیلوس سیکی	۸۹/۹۰±۱/۵^{a}	۸۳/۳۵±۱/۳۷^{b}	۷۹/۴۴±۲/۱۲^{c}	۷۳/۶۵±۰/۹۰^{d}	۷۱/۱۲±۱/۸۹^{d}

حروف مشابه در مورد هر جدایه، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

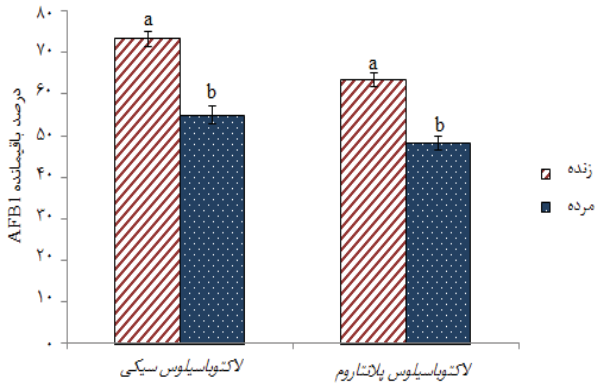
درصد باقیمانده AFB_1 پس از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های صفر (بلافاصله پس از اضافه شدن جدایه و بدون گرمخانه‌گذاری)، ۲۴ و ۴۸ ساعت در حضور جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج (نمودار ۲) نشان داد که درصد باقیمانده AFB_1 در زمان‌های ۰، ۲۴ و ۴۸ ساعت در حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به ترتیب ۶۳/۶۰، ۵۰/۲۸ و ۴۵/۳۴٪ و میزان باقیمانده AFB_1 در حضور جدایه *لاکتوباسیلوس سیکی* به ترتیب ۷۳/۵۵، ۷۱/۷۰ و ۶۳/۱۷٪ بود. براین اساس، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری به طور معنی‌داری از توانایی بیشتری در حذف AFB_1 در مقایسه با *لاکتوباسیلوس سیکی* برخوردار بود (P<۰/۰۵). با مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح ۹۵٪ نیز مشخص شد که میزان باقیمانده

AFB_1 در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقایسه با مقدار آفلاتوکسین در زمان صفر، تفاوت معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). علاوه بر این، بین میزان باقیمانده AFB_1 در حضور *لاکتوباسیلوس سیکی* در زمان صفر نسبت به ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ولی بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری این تفاوت، معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).



نمودار ۲- مقایسه توانایی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* در حذف AFB_1 در زمان‌های مختلف گرمخانه‌گذاری.
حروف مشابه در هر زمان، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

میزان باقیمانده آفلاتوکسین در حضور سلول زنده در مقایسه با سلول مرده (اتوکلاو شده به مدت ۱۵ دقیقه) جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه نیز نشان داد (نمودار ۳) که میزان باقیمانده آفلاتوکسین پس از تیمار حرارتی در هر دو جدایه نسبت به سلول‌های زنده به طور معنی‌داری کاهش یافت (P<۰/۰۵). براساس نتایج به دست آمده، میزان باقیمانده آفلاتوکسین در حضور جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* پس از اعمال تیمار حرارتی از ۶۳/۶ به ۴۸/۱٪ و در حضور جدایه *لاکتوباسیلوس سیکی* نیز از ۷۳/۵۵ به ۵۴/۹۸٪ کاهش یافت.



نمودار ۳- مقایسه توانایی سلول‌های زنده و غیر زنده لاکتیکی بر میزان حذف AFB_1.
حروف مشابه در مورد هر باکتری، نمایانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) است.

بحث

اخیرا گزارش‌های متعددی درباره قابلیت کاهش آفلاتوکسین و فعالیت‌های ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک جهت استفاده از آنها به عنوان نگهدارنده‌های زیستی به جای افزودنی‌های شیمیایی (به دلیل خطر ابتلا به سرطان) و آنتی-بیوتیک‌ها (به دلیل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی) گزارش شده است (Gerbaldo et al., 2012; Oliveira et al., 2014). گواراما و بولرمن (۱۹۹۵) به بررسی تاثیر مخلوطی از گونه‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از سیلوهای تجاری بر کاهش رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و تولید آفلاتوکسین پرداختند. این محققین دریافتند که سلول‌های در حال رشد *لاکتوباسیلوس* قادر به ممانعت کامل از جوانه‌زنی اسپورهای قارچی هستند اما سوپرناتانت کشت این باکتری‌ها علیرغم جلوگیری از رشد قارچ، در تخریب اسپورهای آن تاثیری ندارند. علاوه بر این، کاهش pH تا ۴ با استفاده از اسید کلریدریک و اسید لاکتیک در کشت تخمیر نشده باکتری‌های مذکور، منجر به بروز اثرات بازدارندگی متفاوتی بر جوانه‌زنی اسپور این قارچ شد. کشت مخلوط باکتری‌های اسید لاکتیک و *آسپرژیلوس فلاووس*، ضمن ممانعت از توسعه قارچ، تولید AFB_1 را نیز محدود ساخت اما سوپرناتانت کشت این باکتری‌ها صرفا از تولید آفلاتوکسین جلوگیری کرد و تاثیری بر رشد قارچ نداشت (Gourama and Bullerman, 1995). لاورمیکوکا و همکاران (۲۰۰۰) نیز توانستند گونه-های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک را از خمیرترش، جدا کرده و فعالیت ضد قارچی آنها را بررسی نمایند. این محققین دریافتند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه 21B، با تولید ترکیبات فنیل لاکتیک اسید و ۴- هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید، توانایی مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* را دارا می‌باشد (Lavermicocca et al., 2000). والریو و همکاران (۲۰۰۹) توانستند از بین ۱۲۵ باکتری جدا شده از آرد کامل گندم دوروم، باکتری‌های *ویسلا کونفوسا*، *ویسلا سیباریا*، *لویکونوستوک مزنتروئیدوس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* با اثرات بازدارندگی قوی بر علیه کپک‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *پنی-سیلیوم راکیوفورتی* و *اندومایسس فیبولیجر* را شناسایی کنند (Valerio et al., 2009). از دلایل بروز اثرات ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توان به تولید اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، دی استیل و ترکیبات پپتیدی زیست‌فعال توسط آنها اشاره کرد. البته فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اسید لاکتیک به اثر سینرژیستی این ترکیبات نیز ارتباط دارد (Kabak et al., 2006). باکتری‌های اسید لاکتیک علاوه بر مهار رشد قارچ‌های توکسین‌زا، توانایی اتصال به توکسین‌هایی نظیر AFB_1 و کاهش این سموم را نیز دارند. ال-نظامی و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی توانایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *پروپیونی‌باکتریوم شرمانی* در کاهش AFB_1 دریافتند که در شرایط یکسان و صرفا بسته به نژاد باکتری، توانایی کاهش میزان آفلاتوکسین از مایع گوارشی در شرایط آزمایشگاهی و همچنین مقدار تجمع و جذب آفلاتوکسین در بافت‌های گوارشی موجود زنده متفاوت است (El-Nezami et al., 2000). هاثوت و همکاران (۲۰۱۱) نیز نقش حفاظتی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس روتری* را در مقابل تنش‌های اکسیداتیو ناشی از تلقیح خوراکی آفلاتوکسین به موش بررسی نمودند. بر اساس یافته‌های این محققین، هر دو باکتری مذکور، ضمن بهبود بارز پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون در حضور آفلاتوکسین و حفاظت از بافت کبد، از ایمنی لازم برای استفاده در تولید مواد غذایی فراسودمند برخوردار بودند. همچنین *لاکتوباسیلوس روتری* توانایی بیشتری برای حفاظت از تنش‌های اکسیداتیو ناشی از تلقیح آفلاتوکسین در سرم خون داشت (Hathout et al, 2011). نیکبخت نصرآبادی و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان دادند که استفاده از

لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان مکمّل غذایی ضمن تاثیر بر پارامترهای بیوشیمیایی پلاسمای خون موش می‌تواند سطح AFB_1 را نیز در سرم خون کاهش دهد (Nikbakht Nasrabadi et al., 2013).

نتایج این پژوهش نیز نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* جدا شده از خمیرترش آرد کامل گندم، توانایی مهار رشد *آسپرژیلوس فلاووس* توکسین‌زا را دارند. البته میزان بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به شکل معنی‌داری بیشتر از *لاکتوباسیلوس سیکی* بود ($P<0/05$). براین اساس، حداقل جمعیت سویه‌های مورد مطالعه برای کاهش معنی‌دار میزان آفلاتوکسین، متفاوت است. دلیل اصلی تفاوت در حداقل جمعیت مؤثر سویه‌های مختلف باکتریایی جهت کاهش معنی‌دار آفلاتوکسین، هنوز به طور کامل مشخص نیست اما چنین به نظر می‌رسد که با توجه به محدود بودن میزان آفلاتوکسین تلقیح شده و با افزایش جمعیت باکتریایی از حداقل لازم، شانس دسترسی جمعیت اضافه شده به آفلاتوکسین، کاهش یافته و همچنین ساختار دیواره سلولی این باکتری‌ها که مهم‌ترین عامل مؤثر آنها در حذف آفلاتوکسین به شمار می‌آید نیز دستخوش تغییر گردد (El-Nezami et al., 2000). باید در نظر داشت که جمعیت سلول باکتریایی، مهم‌ترین عامل تاثیرگذار بر میزان کاهش آفلاتوکسین است لذا می‌بایست برای محافظت مصرف کننده در برابر AFB_1، جمعیت مناسبی از باکتری را در رژیم غذایی مورد استفاده قرار داد. البته عموما نمی‌توان بیشتر از ۹۰٪ آفلاتوکسین موجود در محیط را صرفا با افزایش جمعیت باکتریایی برخی از سویه‌ها حذف نمود زیرا اتصال آفلاتوکسین به دیواره سلولی این باکتری‌ها، فرایندی برگشت‌پذیر بوده و علاوه بر این به جز جمعیت باکتریایی، مقدار توکسین اولیه، دمای گرمخانه‌گذاری و pH نیز در میزان جذب و کاهش آفلاتوکسین تاثیر دارد (Bueno et al., 2007).

ال-خواری و همکاران (۲۰۱۱) نیز توانایی اتصال *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به AFM_1 را پس از ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری ۳۸/۷٪ و در مورد *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* ۱۹/۸٪ گزارش نمودند در حالی که میزان اتصال باکتری‌های مذکور با AFM_1 پس از ۱۴ ساعت گرمخانه-گذاری به ترتیب به ۸۷/۶ و ۷۰٪ رسید (El-Khoury et al., 2011). پلتونن و همکاران (۲۰۰۱) نیز دریافتند که پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری، توانایی *لاکتوباسیلوس آمیلووروس* در حذف آفلاتوکسین افزایش می‌یابد (Peltonen et al., 2001). هاسکارد و همکاران (۲۰۰۱) با ارائه نتایج مناقضی ضمن ارزیابی اتصال اختصاصی AFB_1 موجود در فراورده‌های لبنی با باکتری‌های اسید لاکتیک دریافتند که این فرایند به سرعت اتفاق افتاده و بیش از یک دقیقه به طول نمی‌انجامد (Haskard et al., 2001). محققین دیگری نیز تفاوت معنی‌داری در حذف AFB_1 به وسیله *پروپیونی‌باکتریوم* و چند گونه باکتری اسیدلاکتیک با گذشت زمان گرمخانه‌گذاری مشاهده نکردند (El-Nezami et al., 2000). براساس نتایج این محققین، زمان گرمخانه‌گذاری، تاثیری بر میزان کاهش آفلاتوکسین ندارد زیرا برای حذف آفلاتوکسین، ورود آن به سلول و تبدیل متابولیکی این مایکوتوکسین ضروری نیست. بر این اساس، نقش اصلی در حذف آفلاتوکسین توسط باکتری‌های اسید لاکتیک به ترکیبات دیواره سلولی این باکتری‌ها نسبت داده می‌شود. از دلایل تقابل نتایج پژوهش اخیر با نتایج محققین مذکور در خصوص تاثیر معنی‌دار زمان گرمخانه‌گذاری در حذف آفلاتوکسین می‌توان به تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری، غلظت اولیه آفلاتوکسین، نوع جدایه مورد بررسی و جمعیت آن، همچنین pH و دمای گرمخانه‌گذاری اشاره کرد (Haskard et al., 2001; Lee et al., 2003).

ال-نظامی و همکاران (۱۹۹۸) با ارزیابی تاثیر تیمارهای فیزیکی و شیمیایی متفاوت بر میزان اتصال دو سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به AFB_1 نشان دادند که از بین تیمارهای مورد مطالعه، صرفا تیمار با اسید هیدروکلریدریک و تیمار حرارتی با اتوکلاو و حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به طور معنی‌داری قابلیت اتصال را بهبود دادند. البته تیمارهای حرارتی مذکور از تاثیر کمتری در مقایسه با اسید برخوردار بودند و تیمار با اتانول، اشعه ماوراء بنفش، امواج فرا صوت و قلیا تاثیری بر قابلیت اتصال این باکتری‌ها به AFB_1 نداشته و یا حتی مقدار آن را کاهش دادند (El-Nezami et al., 1998). هاسکارد و همکاران (۲۰۰۱) نیز در ارزیابی تاثیر باکتری‌های زنده و غیر زنده تیمار شده با اتوکلاو و اسید در اتصال به AFB_1 دریافتند که اتصال فیزیکی خارج سلولی با پوشش بیرونی باکتری، مهم‌ترین عامل حذف این مایکوتوکسین توسط سلول‌های زنده و یا تیمار شده با اتوکلاو بوده ولی تیمار با اسید ممکن است به اتصالات داخل سلولی نیز منجر گردد. علاوه بر این در تمام نمونه‌های مذکور، میزان پایداری کمپلکس تشکیل شده بین آفلاتوکسین با باکتری، بسته به نژاد باکتری، تیمار مورد استفاده و شرایط محیطی متفاوت بود (Haskard et al., 2001). ساختار طبیعی ترکیبات مؤثر در اتصال AFB_1 به دیواره سلول باکتری هنوز کاملا شناخته نشده است اما به نظر می‌رسد که کربوهیدرات-های غنی از مانو پروتئین‌ها یا گلیکان‌ها در این فرایند نقش داشته باشند. تیمار حرارتی ممکن است سبب دناتوره شدن پروتئین و شکل‌گیری هزاران واکنش بینابینی در دیواره سلولی شود. همچنین حرارت می‌تواند با انحلال برخی از واحدهای مانانی سطح سلول، ضمن افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی، در نهایت سبب افزایش دسترسی جایگاه‌های اتصال و حذف بیشتر آفلاتوکسین گردد (Haskard et al., 2001; Lee et al., 2003).

براساس نتایج این پژوهش، جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس سیکی* بر کاهش رشد *آسپرژیلوس فلاووس* و کاهش AFB_1 مؤثر بودند. همچنین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به شکل معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) از قابلیت بیشتری در کاهش میزان AFB_1 برخوردار بود. میزان حذف AFB_1 پس از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری نسبت به زمان صفر، افزایش یافت و سلول غیر زنده این جدایه‌ها در مقایسه با سلول زنده آنها به نحو مؤثرتری توانست AFB_1 را کاهش دهد. لذا با توجه به قابلیت جدایه‌های لاکتیکی مورد مطالعه در این پژوهش می‌توان از آنها به عنوان کشت آغازگر و یا کشت همراه در فرآوری مواد غذایی مختلف استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش را از محل گرنت پژوهشی طرح خاتمه یافته به شماره شناسه ۱۵-۳۱۴-۹۲ با عنوان "جداسازی و شناسایی آغازگرهای لاکتوباسیلوس غالب موجود در خمیرترش حاصل از آرد نان سنگک" تامین نمودند، قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Bueno, D., Casale, C., Pizzolitto, R., Salvano, M., and Oliver, G. 2007. Physical adsorption of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. J Food Protect. 70: 2148-2154.
2. Coloretti, F., Carri, S., Armaforte, E., Chiavari, C., Grazia, L., and Zambonelli, C. 2007. Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. FEMS Microbiol Lett. 271: 245–250.
3. Corsetti, A., Gobetti, M., Rossi, J., and Damiani, P. 1998. Antimould activity of sourdoughs lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl Microb Biotecnhol. 50: 253–256.
4. El-Khoury, A., Atoui, A., and Yaghi, J. 2011. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. Food Control. 22: 1695-1699.
5. El-Nezami, H.S., Kankaanp, P., Salminen, S.J., and Ahokas, J.T. 1998. Ability of dairy strains of acid lactic bacteria to bind food carcinogens. Food Chem Toxicol. 36: 321-326.
6. El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., and Ahokas, J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. J Food Protect. 4: 549-552.
7. Fazeli, M.R., Shahverdi, M.R., Sedaghat, B., Jamalifar, H., and Samadi, N. 2004. Sourdough-isolated Lactobacillus fermentum as a potent anti-mould preservative of a traditional Iranian bread. Eur Food Res Techno. 218: 554–556.
8. Ferchichi, M., Valcheva, R., Vost, H., Onno, B., and Dousset, X. 2007. Molecular identification of the microbiota of french sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiol. 24: 678–686.
9. 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.
10. Gourama, H., and Bullerman, L.B. 1995. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J Food Protect. 11: 1249-1256.
11. Haskard, C.A., El-Nezami, H.S., Kankaanpaa, P.E., Salminen, S., and Ahokas, J.T. 2001. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. Appl Environ Microbiol. 67: 3086–3091.
12. Hathout, A.S., Mohamed, S.R., El-Nekeety, A.A., Hassan, N.S., Aly, S.E., and Abdel-Wahhab, M.A. 2011. Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. Toxicon. 58: 179–186.
13. Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H.S., and Steele, J.L. 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. Food Chem Toxicol. 47: 1064-1068.

14. Hernandez-Mendoza, A., Gonzalez-Cordova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., and Garcia, H.S. 2011. Effect of oral supplementation of *Lactobacillus reuteri* in reduction of intestinal absorption of aflatoxin B1 in rats. J Basic Microbiol. 51: 263–268.
15. Kabak, B., Dobson, A.D., and Var, I. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Crit Rev Food Sci Nutr. 46: 593-619.
16. Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., and Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. J App Microbiol. 66: 4084-4090.
17. Lee, Y., El-Nezami, H., Haskard, C., Gratz, S., Puong, K., Salminen, S., and Mykknen, H. 2003. Kinetics of adsorption and desorption of aflatoxin B1 by viable and nonviable bacteria. J Food Protect. 66: 426-430.
18. Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J., and Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett. 219: 129-135.
19. Mortazavi, S.A., and Sadeghi, A. 2011. Investigating the sourdough potential for enhance microbiological shelf life and roasty aroma of traditional Lavash bread. Afr J Biotech. 10: 9668–9672.
20. Nikbakht Nasrabadi, E., Jamaluddin, R., Abdul Mutalib, M.S., Khaza'ai, H., Khalesi, S., and Mohd Redzwan, S. 2013. Reduction of aflatoxin level in aflatoxin-induced rats by the activity of probiotic *Lactobacillus casei* strain Shirota. J Appl Microbiol. 114: 1507–1515.
21. 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.
22. Peltonen, K., El-Nezami, H., Haskard, C., Ahokas, J., and Salminen, S. 2001. Aflatoxin B1 binding by dairy strains of lactic acid bacteria and bifidobacteria. Dairy Sci. 84: 2152-2156.
23. Shetty, P.H., Hald, B., and Jespersen, L. 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. Int J Food Microbiol. 113: 41-46.
24. Tropcheva, R., Nikolova, D., Evstatieva, Y., and Danova, S. 2014. Antifungal activity and identification of Lactobacilli, isolated from traditional dairy product “katak”. Anaerobe. 28: 78-84.
25. Valerio, F., Favilla, M., Bellis, P.D., Sisto, A., Candia, S.D., and Lavermicocca, P. 2009. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. Syst Appl Microbiol. 32: 438-448.
26. Wu, Q., Jezkova, A., Yuan, Z., Pavlikova, L., Dohnal, V., and Kuca, K. 2009. Biological degradation of aflatoxins. Drug Metab Rev. 41: 1-7.

27. Zinedine, A., Faid, M., and Benlemlih, M. 2005. In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan sourdough bread. Int J Agri Biol. 57: 67-70.

Evaluating the potential of dominant *Lactobacillus* isolated from whole wheat sourdough in reduction of Aflatoxin B1

Alireza Sadeghi[1]*, Maryam Ebrahimi[2], Mojtaba Raeisi[3]

1. Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
2. PhD Student of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
3. Cereal Health Research Center, Golestan University of Medical Science.

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

Received: 09 February 2016 Accepted: 15 January 2016

Abstract

The aim of this study was evaluatiing the amount of aflatoxin B_1 and growth of *Aspergillus flavus* under effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* isolated from sourdough of whole wheat flour. After confirmation of mentioned isolated LAB with specific PCR, effects of these isolates on growth of *Aspergillus flavus* and their ability to reduction of aflatoxin B_1 based on direct competitive ELISA, were examined. The effects of incubation time (37 °C in 0, 24 and 48 h) and heat treatment (autoclave for 15 min) on residue of aflatoxin B_1 in present of mentioned isolated LAB were also determined. After six days period of investigation the effect of isolated LAB on growth of *Aspergillus flavus*, the diameter of fungi colonies in present of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei* and control sample were 1.87, 6.5 and 9 cm, respectively. The amount of aflatoxin B_1 residue, after 0, 24 and 48 h incubation in present of *Lactobacillus plantarum* were 63.6, 50.28, 45.34% and in present of *Lactobacillus sakei* were also 73.55, 71.7 and 63.17%, respectively. Furthermore, non-viable (autoclaved) cells of mentioned LAB reduced the amount of aflatoxin B_1, more effective ($P< 0.05$) than their viable cells.

Keywords: Direct competitive ELISA, Specific PCR, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Aspergillus flavus*.