

## ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل جدا شده از خمیر ترش‌های سنتی بر علیه

## باسیلوس سرئوس

ابوالفضل گلشن تفتی\*<sup>۱</sup>، غزال یزدانیپناه<sup>۲</sup>، محمدحسن فولادی<sup>۳</sup>

۱. بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرمان، ایران.

۲. مرکز تحقیقات بهداشت محیط، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

\*نویسنده مسئول: golshan\_ta@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۲۶

## چکیده

در این پژوهش، اثر بازدارندگی ۷۱ ایزوله لاکتوباسیل جدا شده از خمیر ترش‌های سنتی روی باکتری *باسیلوس سرئوس* با استفاده از ۳ روش (لکه‌گذاری، چاهک و دیسک کاغذی) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. در روش‌های چاهک و دیسک کاغذی، هیچ‌گونه هاله عدم رشدی در پلیت‌های مربوطه مشاهده نشد ولی اثر بازدارندگی ایزوله‌های لاکتوباسیل در برابر باکتری *باسیلوس سرئوس* در روش لکه‌گذاری به صورت ایجاد هاله‌های شفاف اطراف پرگنه‌های لاکتوباسیل در محیط کشت میکروبی نمایان شد. کلیه ایزوله‌های لاکتوباسیل قادر به جلوگیری از رشد *باسیلوس سرئوس* در روش لکه‌گذاری بودند ولی بین ایزوله‌های لاکتوباسیل از لحاظ خاصیت ضد میکروبی اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.01$ ) وجود داشت. از بین ایزوله‌های لاکتوباسیل مورد ارزیابی، ۸ ایزوله به‌طور معنی‌داری دارای فعالیت ضد میکروبی قویتری بودند و قطر هاله شفاف در اطراف پرگنه این ایزوله‌ها در محدوده ۷/۸۳-۲/۶۷ میلی-متر گزارش گردید. ایزوله‌های لاکتوباسیل شماره ۷۰، ۴۶، ۲۱، ۵۵، ۵۹ و ۱۱ با ایجاد هاله شفاف به ترتیب به قطر ۷/۸۳، ۷/۶۷، ۷/۳۳، ۷/۱۶ و ۷ میلی‌متر به‌عنوان ایزوله‌های لاکتوباسیل با فعالیت ضد میکروبی قوی در روش لکه‌گذاری گزارش شدند. این ایزوله‌ها می‌توانند پتانسیل استفاده به‌عنوان کشت‌های آغازگر را در تهیه خمیر ترش و تولید نان دارا باشند.

**واژگان کلیدی:** لاکتوباسیلوس، *باسیلوس سرئوس*، روش چاهک، روش لکه‌گذاری، روش دیسک کاغذی.

## مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک، فعالیت ضد میکروبی آن‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد نظیر *هلیکوباکتر پیلوری* (عامل زخم معده)، *باسیلوس سابتیلیس* و *باسیلوس لیچنیفورمیسی* است (Katina et al., 2002; Medouakh et al., 2010). فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک به دلیل تولید ترکیباتی مانند اسیدهای آلی

کشت‌های آغازگر خمیر ترش دارای باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که با تولید متابولیت‌های مختلف در ایجاد عطر و طعم، افزایش زمان ماندگاری، کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فساد مواد غذایی و قوام محصول نقش دارند. (Simşek et al., 2006). یکی از مهم‌ترین خواص تکنولوژیکی

بوده، میزان رشد آن‌ها در مغز نان سریع‌تر است و در طول رشد، تولید آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز می‌کنند (2005 Katina). باکتری‌های باسیلوس سرئوس و باسیلوس مگاتریوم نیز از باکتری‌های مهم ایجادکننده فساد طنابی در نان گزارش شده‌اند (Simsek et al., 2006). کاتینا و همکاران استفاده مؤثر از خمیرترش در جلوگیری از فساد طنابی در نان را نتیجه کنترل دقیق فرآیند تخمیر و حصول اسیدیته به میزان کافی در خمیرترش و نان گزارش کردند. انتخاب کشت‌های آغازگر با پتانسیل ضد میکروبی نقش خمیرترش را در جلوگیری از فساد طنابی تشدید می‌کند (Katina et al., 2002).

در این پژوهش، فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل جدا شده از خمیرترش‌های سنتی بر علیه باکتری باسیلوس سرئوس با تکنیک‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است.

#### مواد و روش کار

در این پژوهش از محیط کشت لاکتوباسیلوس (MRS broth) و محیط کشت مغذی باسیلوس سرئوس (BHI agar) شرکت مرک آلمان استفاده شد.

آماده‌سازی ایزوله‌های لاکتوباسیل و باکتری باسیلوس سرئوس

مطالعه اخیر از نوع مشاهده‌ای است. تعداد ۷۱ ایزوله لاکتوباسیل که طی مطالعات قبلی از خمیرترش‌های سنتی جداسازی شده بودند (گلشن تفتی، ۱۳۹۱)، به محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیل‌ها منتقل شدند. برای این منظور، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ذخیره هر یک از ایزوله‌های لاکتوباسیل، تحت شرایط استریل به ۱۰ میلی‌لیتر محیط MRS broth تلقیح شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت یک شب گرمخانه‌گذاری گردید. باکتری باسیلوس سرئوس (*Bacillus Cereus* PTCC NO: 1154) به صورت آمپول لیوفیلیزه و از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های

(اسیدلاکتیک، اسیداستیک)، پراکسید هیدروژن، اتانول، دی‌اکسید کربن، باکتریوسین‌ها و دی‌استیل است (2002 Messens and De Vuyst). کرسی و همکاران در سال ۱۹۹۶ خصوصیات مواد ممانعت‌کننده شبه باکتریوسین‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در خمیرترش را بررسی نمودند که نتایج حاصله حاکی از فعالیت ضدباکتریایی و محدودکنندگی آن‌ها بود (Corsetti et al., 1996). گونه‌های مختلف از جنس لاکتوباسیل از میکروارگانیسم‌های فعال در خمیرترش می‌باشند که دارای فعالیت ضد میکروبی هستند. سیزکینه و همکاران در مطالعه دیگری، اثر ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک را روی باکتری‌های بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های جدا شده از غذاها و کنترل آن‌ها در نان گندم مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که لاکتوباسیل‌ها از رشد باکتری‌های باسیلوس سرئوس، سودوموناس و قارچ پنی-سلیم جلوگیری کردند (Cizeikiene et al., 2013). والرئو و همکاران اثر تخمیری لاکتوباسیلوس پلانتاروم را در نان و جلوگیری از ایجاد فساد طنابی گزارش نمودند. بعد از کپک‌زدگی، فساد طنابی مهم‌ترین دلیل فساد میکروبی در نان است. فساد طنابی معمولاً به وسیله گونه‌های باسیلوس مخصوصاً سابتیلیس و لیچنیفورمیس ایجاد می‌شود (et al., 2008 Valerio). در صورتی که هر دو باکتری به تعداد  $10^5$  cfu/g در مغز نان وجود داشته باشند، منجر به مسمومیت می‌شوند. این تعداد باکتری تنها بعد از ۲ روز نگهداری نان در دمای اتاق حاصل می‌شود. البته همه سویه‌های باسیلوس سابتیلیس سبب فساد طنابی نمی‌شوند. بر اساس گزارش پژوهشگران، ۴۸ درصد از ۲۵ سویه سابتیلیس جدا شده از منابع نانویی قادر به ایجاد فساد طنابی در مدت ۷ روز نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. سویه‌های تشکیل‌دهنده فساد طنابی، متفاوت از سویه‌های دیگر هستند. این سویه‌ها دارای هاگ‌های مقاوم به حرارت

محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و هاله عدم رشد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Matar et al., 2002; Felten et al., 2003). برای تهیه سوپرناتانت عاری از سلول باکتری، ایزوله‌های لاکتوباسیل پس از کشت در محیط MRS broth، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در  $12000 \times g$  سانتریفوژ گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام گردید و نتایج حاصله با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

### نتایج

در این پژوهش، فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل جدا شده از خمیرترش‌های سنتی علیه باکتری باسیلوس سرئوس با ۳ روش مجزا، مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. ایزوله‌های لاکتوباسیل در روش‌های چاهک و دیسک، فعالیت ممانعت‌کنندگی را نشان ندادند به طوری که هیچ‌گونه هاله عدم رشدی در پلیت‌های مربوطه مشاهده نشد (شکل ۱). روش لکه‌گذاری برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل در برابر باکتری باسیلوس سرئوس مناسب‌تر از دو روش دیگر بود. اثر ممانعت‌کنندگی ایزوله‌های لاکتوباسیل در برابر باکتری باسیلوس سرئوس در روش لکه‌گذاری به صورت ایجاد هاله‌های شفاف اطراف پرگنه‌های لاکتوباسیل در محیط کشت میکروبی نمایان شد. اندازه این هاله‌ها بر اساس شدت و ضعف فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌ها متفاوت بود (شکل ۲) و بین ایزوله‌های لاکتوباسیل از لحاظ خاصیت ضد میکروبی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (جدول ۲). نتایج آزمون لکه‌گذاری، اثر ممانعت‌کنندگی کلیه ایزوله‌های لاکتوباسیل را در برابر

صنعتی ایران تهیه شد که پس از انتقال به سطح محیط BHI agar، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی

لکه‌گذاری (Spot on lawn method)

در این روش، ۲۰ میکرولیتر از کشت فعال ایزوله‌های لاکتوباسیل بر سطح پلیت حاوی محیط کشت MRS agar قرار داده شد و پس از خشک‌شدن لکه‌ها، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس روی سطح پلیت‌ها، لایه نازکی از محیط کشت BHI agar که حاوی ۴ درصد (وزنی-حجمی) کشت باسیلوس سرئوس ۲۴ ساعته بود، ریخته شد. اثر بازدارندگی پس از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۲۴ ساعت از طریق بررسی هاله عدم رشد در اطراف لکه‌ها مشخص گردید (Kalui et al., 2009).

چاهک (Well diffusion agar)

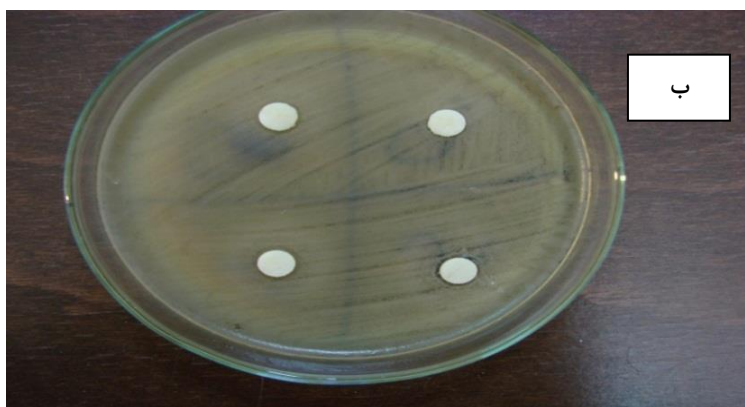
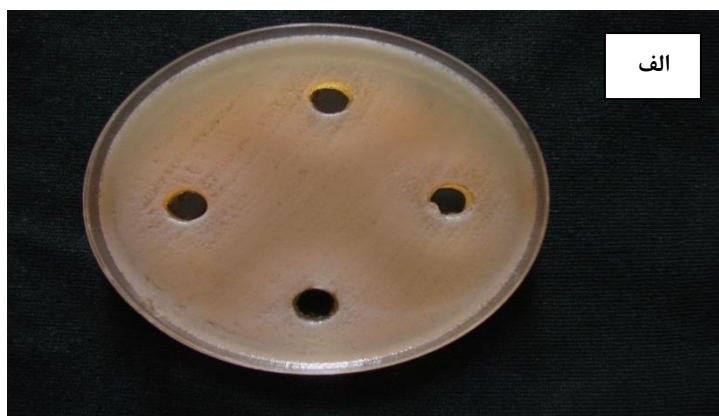
باکتری رشد کرده در محیط کشت BHI broth به وسیله سوآپ استریل روی سطح محیط BHI agar کشت داده شد. سپس با انتهای پیپت پاستور، روی سطح این محیط کشت، چاهکی به قطر ۱ سانتی‌متر ایجاد و درون آن محلول رویی (سوپرناتانت) ایزوله‌های لاکتوباسیل به میزان ۰/۵ میلی‌لیتر ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، هاله‌ی عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت (Holder and Boyce, 1994; Boyanova et al., 2005).

دیسک کاغذی (Disc diffusion method)

ابتدا از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری باسیلوس سرئوس به وسیله سوآپ روی محیط BHI agar کشت داده سپس دیسک‌های کاغذی آغشته به محلول رویی (سوپرناتانت) ایزوله‌های لاکتوباسیل با فاصله از لبه پلیت روی سطح

داده شده است، ایزوله‌های لاکتوباسیل شماره ۱۴ و ۳۷ به ترتیب با قطر هاله ۳/۸۳ میلی‌متر و ۲/۶۷ میلی‌متر، اثر ممانعت‌کنندگی ضعیفی را در برابر باکتری باسیلوس سرئوس نشان دادند.

باکتری باسیلوس سرئوس نشان داد. از بین ایزوله‌های لاکتوباسیل مورد ارزیابی، ۸ ایزوله به‌طور معنی‌داری دارای فعالیت ضد میکروبی بالاتری بودند و قطر هاله شفاف در اطراف پرگنه این ایزوله‌ها در محدوده ۲/۶۷-۷/۸۳ میلی‌متر گزارش گردید (جدول ۱). همانطور که در جدول ۱ نشان



شکل ۱- ارزیابی فعالیت ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل علیه باسیلوس سرئوس با روش‌های چاهک (الف) و دیسک (ب)



شکل ۲- هاله شفاف ممانعت‌کننده از رشد باسیلوس سرئوس اطراف پرگنه‌های لاکتوباسیل در روش لکه‌گذاری. هاله شفاف با قطر کم در اطراف پرگنه لاکتوباسیل، بیانگر فعالیت ضد میکروبی ضعیف است.

ایزوله‌های لاکتوباسیل شماره ۷۰، ۴۶، ۲۱، ۵۵، ۵۹ و ۱۱ به ترتیب با ایجاد هاله شفاف به قطر ۷/۸۳، ۷/۶۷، ۷/۳۳، ۷/۱۶، ۷ و ۷ میلی‌متر به‌عنوان ایزوله‌های لاکتوباسیل با اثر بازدارندگی قوی گزارش شدند.

جدول ۱- اثر بازدارندگی ایزوله‌های لاکتوباسیل در برابر باکتری باسیلوس سرئوس با روش لکه‌گذاری

شماره جدایه	فعالیت ضد میکروبی (میلی‌متر ناحیه شفاف)
۷۰	۷/۸۳ <sup>a*</sup>
۴۶	۷/۶۷ <sup>a</sup>
۲۱	۷/۳۳ <sup>ab</sup>
۵۵	۷/۱۶ <sup>abc</sup>
۵۹	۷ <sup>abcd</sup>
۱۱	۷ <sup>abcd</sup>
۱۴	۳/۸۳ <sup>e</sup>
۳۷	۲/۶۷ <sup>f</sup>

میانگین‌های دارای حروف متفاوت، در سطح احتمال ۵ درصد با هم اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس برای خاصیت ضد میکروبی با روش لکه‌گذاری

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه	۷۰	۰/۰۰**
خطا		۱۴۲
CV		۲۱/۰۹

\*\* اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد.

## بحث

در روش لکه‌گذاری بود. کادیرسی و سیتاک (Çadirci and Citak, 2005) روش لکه‌گذاری را برای ارزیابی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک مناسب گزارش کردند. نتایج مشابهی نیز توسط سیمسک و همکاران ارائه شده است (Simsek et al., 2006). در طول دوره ارزیابی با روش لکه‌گذاری، متابولیت‌هایی نظیر اسیدهای لاکتیک و استیک، باکتریوسین و غیره تولید می‌شوند که در مؤثر بودن

تکنیک‌های متعددی برای ارزیابی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک وجود دارد که می‌توان به روش چاهک، دیسک، لکه‌گذاری و غیره اشاره کرد. در پژوهش اخیر، ارزیابی اثر ضد میکروبی ایزوله‌های لاکتوباسیل جدا شده از خمیرترش‌های سنتی در برابر باسیلوس سرئوس بیانگر توانایی همه ایزوله‌ها در کنترل رشد باسیلوس سرئوس

مهمی را در جلوگیری از فساد طنابی در نان می‌توانند داشته باشند. این در صورتی است که خمیرترش تهیه‌شده از این سویه‌ها به خمیر نان اضافه گردد. در هر حال، استفاده از سویه‌هایی از باکتری‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده باکتریوسین به‌عنوان آغازگر و یا کشت محافظ ممکن است به تولید مواد غذایی ایمن‌تر کمک نماید (et al., 2007). علاوه بر آن، باکتریوسین‌ها در کاهش استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی در صنعت مواد غذایی می‌توانند مؤثر باشند (Corsetti and Settanni, 2007). ساوادوگو و همکاران اظهار داشتند که فعالیت ضد میکروبی، تولید اگزوپلی‌ساکارید و توانایی در اسیدی‌کردن سریع، از مهم‌ترین عوامل در انتخاب سویه‌های لاکتوباسیل به‌عنوان کشت آغازگر است (Savado et al., 2008). در این پژوهش، ایزوله‌های شماره ۷۰، ۴۶، ۲۱، ۵۵، ۵۹ و ۱۱ با ایجاد هاله شفاف به ترتیب به قطر ۷/۸۳، ۷/۶۷، ۷/۳۳، ۷/۱۶، ۷ و ۷ به‌عنوان ایزوله‌های لاکتوباسیل با فعالیت ضد میکروبی قوی گزارش شدند. ایزوله‌های لاکتوباسیل مذکور پس از شناسایی مولکولی و انجام آزمایشات تکمیلی پخت، پتانسیل استفاده به‌عنوان کشت‌های آغازگر را در تهیه خمیرترش و تولید نان دارا هستند.

این روش در ارزیابی فعالیت ضد میکروبی نقش دارند. در - هر حال، در خصوص فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک مطالعات گسترده‌ای صورت گرفته است. کاظمی درسنگی و همکاران (۱۳۸۹) فعالیت ضد میکروبی سوپرناتانت باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از ماست و قرص پروبیوتیکی را مورد بررسی قرار دادند. این باکتری‌ها فعالیت ضد میکروبی خوبی در برابر هفت باکتری بیماری‌زا از خود نشان دادند. باکتری‌های گرام مثبت نسبت به باکتریوسین تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک حساس‌تر از باکتری‌های گرام منفی می‌باشند. مقاومت باکتری‌های گرام منفی به دلیل پوشش سلولی آن‌ها است (Savado et al., 2004). باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای اثرات آنتاگونیستی روی باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد در مواد غذایی هستند. مواد ضد میکروبی که به‌وسیله باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید می‌شود در کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا و مولد فساد در مواد غذایی نقش دارد. تودورو و همکاران (Todorov et al., 1999) گزارش کردند که لاکتوباسیلوس پلانتاروم از رشد باکتری باسیلوس سابتیلیس جلوگیری کرد. منتس و همکاران گزارش کردند که سویه‌های لاکتوباسیل تولیدکننده باکتریوسین نقش

## منابع

۱. گلشن تفتی، ابوالفضل. (۱۳۹۱). کاربرد خمیرترش تازه و خشک حاوی لاکتوباسیل‌های غالب در خمیر نان‌های محلی آذربایجان شرقی در بهبود کیفیت نان. رساله دکتری تخصصی در رشته علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تبریز، ۱۵۴ صفحه.
  ۲. کاظمی درسنگی، ر.، قائمی، ن. و میرپور، میرسان. (۱۳۸۹). بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک جدا شده از محصولات پروبیوتیکی
- (لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم). مجله علمی-پژوهشی زیست‌فناوری میکروبی، شماره ۷، صفحه ۳۶-۲۹.
3. Boyanova, L., Gergova, G., Nikolov, R., Derejian, S., Lazarova, E. and Katsarov, N. 2005. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. *J Med Microbiol.* 54: 481-483.



4. Çadirci, B.H. and Citak, S. 2005. A comparison of two methods used for measuring antagonistic activity of lactic acid bacteria. *Pakistan J Nutr.* 4:237-241.
5. Cizeikiene, D., Juodeikiene, G., Paskevicius, 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.* 31:539-45.
6. Corsetti, A., Gobbetti, M. and Smacchi, E. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria, isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C 57. *Food Microbiol.* 13: 447-456.
7. Corsetti, A. and Settanni, L. 2007. Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Res Int.* 40: 539-558.
8. Felten, A., Grandry, B., Lagrange, P. and Casin, I. 2002. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol.* 40: 2766-71.
9. Holder, I. and Boyce, S. 1994. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *Burns.* 20: 426-429.
10. Kalui, C., Mathara, J., Kutima, P., Kiiyukia, C. and Wongo, L. 2009. Functional characteristics of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* from ikii, a Kenyan traditional fermented maize porridge. *Afr J Biotechnol.* 8: 4363-4373.
11. Katina, K. 2005. Sourdough: A tool for the improved flavour, texture and shelf-life of wheat bread. PhD dissertation, Faculty of Agriculture and Forestry. University of Helsinki. VTT Publications.
12. Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H. and Mattila-Sandholm, T. 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *LWT- Food Sci Technol.* 35: 38-45.
13. Matar, M., Ostrosky-Zeichner, L., Paetznick, V., Rodriguez, J., Chen, E. and Rex, J. 2003. Correlation between E-test, disk diffusion, and microdilution methods for antifungal susceptibility testing of fluconazole and voriconazole. *Antimicrobial Agents Chemother.* 47: 1647-1651.
14. Medouakh, L., Ahdeslam, A. and Bensoltane, A. 2010. Antagonistic Activity of *Lactobacillus* sp. against *Helicobacter pylori*. *Int J Microbiol Sci.* 1: 80-86.
15. Mentis, O., Ercan, R. and Akcelic, M. 2007. Inhibitor activities of two *Lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *Bacillus* strains. *Food Control.* 18: 359-363.
16. Messens, W. and De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by



- Lactobacilli isolated from sourdoughs- a review. International J Food Microbiol. 72: 31-43.
17. Savadogo, A., Cheik, A., Ouattara Bassole, I. and Traore, A. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan J Nutr. 3: 174-179.
18. Savadogo, H., Diawara, B., Traoré, A. and Jakobsen, M. 2008. Technological properties of *Lactobacillus fermentum* involved in the processing of dolo and pito, west african sorghum beers, for the selection of starter cultures. J Appl Microbiol. 104: 873-82.
19. Simsek, O., Hilmi Con, A. and Sener Tulumog lu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control. 17: 263–270.
20. Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chabert, M., Ivanova, I. and Dousset, X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. International J Food Microbiol. 48: 167–177.
21. Valerio, F., De Bellis, P., Lonigro, S.L., Visconti, A. and Lavermicocca, P. 2008. Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. International J Food Microbiol. 122:328–332.

## Evaluation of antimicrobial activity of Lactobacilli isolated from traditional sourdoughs against *Bacillus cereus*

Golshan Tafti A<sup>\*1</sup>, Yazdanpanah G<sup>2</sup>, Fooladi MH<sup>3</sup>

1. Agricultural Engineering Research Department, Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Centre, AREEO, Kerman, Iran.
2. Environmental Health Engineering Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

\*Corresponding author: [golshan\\_ta@yahoo.com](mailto:golshan_ta@yahoo.com)

Received: 22 December 2015

Accepted: 17 August 2015

### Abstract

In this study, the inhibitory effect of 71 Lactobacilli isolated from traditional sourdoughs against *Bacillus cereus* was evaluated and compared by using three methods (spot on lawn, well diffusion and disk diffusion). There was no inhibition zone around the discs and wells in the well diffusion and disk diffusion methods. The inhibitory effect of *Lactobacillus* isolates against *Bacillus cereus* in the Spot on lawn method was observed as a clear zone around the colonies. All *Lactobacillus* isolates were able to inhibit the growth of *Bacillus cereus* in the spot on lawn method, but there was a significant difference ( $p < 0.01$ ) among the isolates in terms of antimicrobial activity. Among the *Lactobacillus* isolates, 8 isolates had significantly stronger antimicrobial activity and the diameter of clear zone around the colonies was reported in the range of 2.67-7.83 mm. The diameter of clear zone around the *Lactobacillus* isolates 70, 46, 21, 55, 59 and 11 was 7.83, 7.67, 7.33, 7.16, 7 and 7 mm, respectively. Therefore, they were reported as *Lactobacillus* isolates with strong antimicrobial activity in the spot on lawn method. These isolates can have potential to be used as starter cultures in production of sourdough and bread.

**Keywords:** Lactobacillus, *Bacillus cereus*, Spot on lawn method, Well diffusion method, Disk diffusion method.