Journal of Food Hygiene, Vol. 9, No. 36, Winter 2020

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2020.670898**

Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from Masske, camel dough, and local yogurt against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*

Nasrollahzadeh A.[1], Khomeiri M.[2*], Sadeghi A.[2], Mahmoudi M.[3], Ebrahimi M.[3]

1. M.Sc, Graduated in Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Associate professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Ph.D, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[*]Corresponding author: khomeiri@gau.ac.ir
(Received: 2019/10/27; Accepted: 2020/1/20)

Abstract

In animal and food products, different types of chemical preservatives and antibiotics are used to inhibit the growth of *Aspergillus flavus* and other toxicogenic fungi. The aim of this study was to investigate the antifungal activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Masske, Chal, and local yogurt against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. For this purpose, isolates previously tested for antibacterial effects were used. The isolates of *Lactobacillus plantarum* B38, *Enterococcus faecium* 8C and *Lactobacillus ramonosus* Y89 with the highest inhibitory effect on pathogenic bacteria were selected and their antifungal effects against toxin-producing molds were evaluated using the overlay method. The results showed that lactic acid isolates at the end of the fourth day prevented the growth of *Aspergillus niger* and *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* showed 70.84%, 37.65% and 43.31% of inhibitory activity, respectively. The results also showed that *Lactobacillus rhamnosus* had the highest (62.35%) inhibitory effect on *Aspergillus niger* ($P< 0.05$). The results of the study on the effect of lactic acid isolates on the growth of *Aspergillus flavus* showed that all tested bacteria had inhibitory properties on the molds and *Lactobacillus rhamnosus* with 83.8% had the highest inhibitory effect on *Aspergillus flavus* ($P< 0.05$). Consequently, due to the inhibitory ability of the lactic acid bacteria, they can be used as bio-preservatives along with synthetic preservatives in the food industry.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Antifungal, inhibitory, Lactic acid bacteria, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*

«مقاله پژوهشی»
DOI: 10.30495/JFH.2020.670898

بررسی اثر ضدقارچی باکتری‌های لاکتیکی جدا شده از کره مسکه، دوغ شتر و ماست محلی روی *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر*

احمد نصرالله‌زاده[۱]، مرتضی خمیری[۲*]، علیرضا صادقی[۲]، ماندانا محمودی[۳]، مریم ابراهیمی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳. دانش‌آموخته دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: khomeiri@gau.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۸/۸/۵ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۰/۳۰)

چکیده

در فرآورده‌های غذایی و دامی از انواع مختلف نگه‌دارنده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور مهار رشد *آسپرژیلوس فلاوس* و دیگر قارچ‌های توکسین‌زا استفاده می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدقارچی لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده از کره مسکه، دوغ شتر و ماست محلی علیه کپک‌های توکسین‌زای *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* بود. برای این منظور از بین جدایه‌هایی که قبلاً اثرات ضدباکتریایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته بودند، جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38، *انتروکوکوس فاسیوم* C8 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y89 با بیش‌ترین اثر بازدارندگی بر باکتری‌های بیماری‌زا، انتخاب و تأثیر ضدقارچی آن‌ها در برابر کپک‌های توکسین‌زا با استفاده از روش دولایه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های لاکتیکی در پایان روز چهارم از رشد *آسپرژیلوس نایجر* جلوگیری نمودند و *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌ترتیب ۷۰/۸٤، ۳۷/٦٥ و ٤۳/۳۱ درصد مهارکنندگی از خود نشان دادند. هم‌چنین *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با ٦۲/۳٥ درصد بازدارندگی به شکل معنی‌داری (P< ۰/۰٥) از بالاترین میزان بازدارندگی بر روی *آسپرژیلوس نایجر* برخوردار بود. نتایج بررسی تأثیر جدایه‌های لاکتیکی بر میزان رشد *آسپرژیلوس فلاوس* نیز نشان داد که تمام باکتری‌های مورد آزمون بر روی کپک مذکور دارای خاصیت بازدارندگی بودند و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس با ۷۹/۸۳ درصد مهار* به شکل معنی‌داری (P<۰/۰٥) از بالاترین میزان بازدارندگی بر روی *آسپرژیلوس فلاوس* برخوردار بود. بنابراین با توجه به توانایی مهارکنندگی این جدایه‌ها پیشنهاد می‌شود که از آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی و به‌همراه نگه‌دارنده‌های سنتزی در صنعت غذا استفاده گردد.

واژه‌های کلیدی: ضدقارچی، بازدارندگی، لاکتیک اسید باکتری‌ها، *آسپرژیلوس فلاوس*، *آسپرژیلوس نایجر*

مقدمه

قارچ‌ها ارگانیسم‌های مهمی در فساد محصولات غذایی و سیستم‌های غذایی می‌باشند که سالیانه بالای ۵ تا ۱۰ درصد از تولیدات مواد غذایی جهان در نتیجه فساد به‌وسیله آن‌ها از دست می‌رود (Schnürer and Magnusson, 2005; Rouse *et al*., 2008; Yang and Chang, 2010). بنابراین فساد قارچی به‌وسیله کپک‌ها و مخمرها می‌تواند باعث از دست رفتن و اتلاف قابل‌توجهی از محصولات غذایی و ضررهای اقتصادی ناشی از آن شود (Leyva Salas *et al*., 2018). بر اساس تحقیقات انجام‌گرفته در این زمینه، برآورد شده است که تنها کپک عامل فساد نان، موجب خسارات اقتصادی سالانه بیش از ۲۰۰ میلیون پوند در غرب اروپا می‌شود (Yang and Chang, 2010). علاوه بر این فساد قارچی می‌تواند هم باعث اتلاف محصولات کشاورزی و ضررهای اقتصادی ناشی از آن شود و هم سموم بسیار خطرناکی نظیر مایکوتوکسین‌ها را در مواد غذایی تولید نماید. سرطان‌زایی، تراتوژنی، ایمونوتوکسیک، نوروتوکسیک، نفروتوکسیک، مایکوتوکسیکوزیس و بیماری کاشین–بِک (Kashin–Beck) از مهم‌ترین مشکلات و اثرات منفی مایکوتوکسین‌ها بر سلامت انسان می‌باشند (Sengun *et al*., 2008; Pawlowska *et al*., 2012). گونه‌های متعلق به جنس‌های آسپرژیلوس، فوزاریوم و پنی‌سیلیوم که باعث تولید آفلاتوکسین، فومانیسین، اکراتوکسین، تریکوتسین، پاتولین و زئرالنون می‌شوند، از مهم‌ترین مولدین مایکوتوکسین در غذاها می‌باشند. *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* از مهم‌ترین کپک‌های توکسین‌زا هستند که به‌علت قابلیت تولید کنیدی‌های آلرژی‌زا و آفلاتوکسین B_1 بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (Gaggia *et al*., 2011).

در فرآورده‌های غذایی و دامی از انواع مختلف نگه‌دارنده‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها به‌منظور مهار رشد *آسپرژیلوس فلاوس* و دیگر قارچ‌های توکسین‌زا استفاده می‌شود. اما سازمان‌های بین‌المللی، خواستار کاهش مواد افزودنی شیمیایی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها (به‌دلیل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی) در محصولات غذایی و دامی بوده و تأکید زیادی بر تولید فرآورده‌های با کیفیت بالا دارند که خود مستلزم استفاده از افزودنی‌های سالم با ماندگاری مناسب و تأثیر قابل‌قبول می‌باشد (Burt, 2004). اخیراً گزارش‌های متعددی درباره فعالیت‌های ضدقارچی لاکتیک اسید باکتری‌ها و استفاده از آن‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده‌های زیستی گزارش شده است (Dali *et al*., 2010; Delavenne *et al*., 2012; Gerbaldo *et al*., 2012; Oliveira *et al*., 2014). بر اساس مطالعات گسترده‌ای که در دهه‌های اخیر انجام شده است، باکتری‌های مولد اسید لاکتیک می‌توانند از رشد قارچ‌ها جلوگیری کرده و مانع تولید مایکوتوکسین به‌وسیله آن‌ها شوند (Guimarães *et al*., 2018)؛ در نتیجه باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی و ایمن به‌جای انواع نگه‌دارنده‌های شیمیایی و سنتزی مورد استفاده قرار گیرند (Cortés-Zavaleta *et al*., 2014; Yang and Chang., 2010; Leroy *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2010; Li *et al*., 2014). گزارش‌شده است که *لاکتوباسیلوس آمیلووروس* علیه قارچ‌های شاخص نظیر *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس نایجر*، *فوزاریوم کولموریوم* و *پنی‌سیلیوم راکفورتی* خاصیت بازدارندگی دارد. به‌همین دلیل در تحقیقی

کاربرد *لاکتوباسیلوس آمیلووروس* به‌عنوان یک عامل ضدقارچ کمکی برای افزایش زمان ماندگاری پنیر چدار مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است که نتایج حاکی از آن است که این *لاکتوباسیلوس* می‌تواند باعث افزایش زمان ماندگاری محصول شود (Lynch *et al*., 2014). هم‌چنین در تحقیق دیگری فعالیت ضدقارچی چهار سویه *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از محصول سنتی کاتاک (Katak) علیه قارچ‌های سرطان‌زا، توکسین‌زا و عامل آلرژی از جنس‌های *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم*، *پنی‌سیلیوم* و *تریکودرما* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این گونه *لاکتوباسیلوس* اثر بازدارندگی خوبی بر روی قارچ‌های ذکر شده داشت (Tropcheva *et al*., 2014). بررسی فعالیت ضدقارچی و ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس کورواتوس* جدا شده از پنیر سنتی آذربایجان در مقابل باکتری‌های *لیستریا مونوسایتوژنز*، *باسیلوس سرئوس* و *فوزاریوم* توسط محققین دیگر نیز نشان داد *که این باکتری نیز می‌تواند* از رشد *کلادوسپوریوم* و *فوزاریوم* جلوگیری نماید (Ahmadova *et al*., 2013).

هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدقارچی لاکتیک اسید باکتری‌های جدا شده از محصولات سنتی کره مسکه، دوغ شتر و ماست علیه کپک‌های توکسین‌زا *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* بوده است.

مواد و روش‌ها

- انتخاب سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت آن‌ها

برای این منظور از بین جدایه‌هایی که قبلاً اثرات ضدباکتریایی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته بودند (Nasrollahzadeh *et al*., 2019) شامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 جدا شده از کره مسکه، با بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی بر باکتری‌های گرم منفی، *انتروکوس فاسیوم* C8 جدا شده از چال با بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی بر *لیستریا مونوسایتوژنز* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y89 جدا شده از ماست محلی با بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* از کلکسیون میکروبی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان، انتخاب شدند. جهت بررسی خواص ضدقارچی از کپک‌های توکسین‌زا شامل *آسپرژیلوس فلاوس* PTCC 5004 و *آسپرژیلوس نایجر* PTCC 5012 استفاده شد که از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران واقع در سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید.

به‌منظور فعال‌سازی جدایه‌ها، ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت MRS مایع کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط بی‌هوازی ایجاد شده توسط گازپک در جار بی‌هوازی گرمخانه گذاری شدند. پس از فعال‌سازی نمونه‌ها و خالص‌سازی آن‌ها، نمونه‌های ناخالص حذف شدند و بر روی بقیه نمونه‌ها آزمایش‌های تائید اولیه لاکتیک اسید باکتری‌ها نظیر رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز انجام گرفت. در نهایت در بین همه نمونه‌های خالص‌شده، جدایه‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و بدون اسپور به‌عنوان لاکتیک اسید باکتری‌ها برای شناسایی دقیق مولکولی انتخاب شدند.

- ذخیره و نگهداری طولانی‌مدت جدایه‌ها در دمای ۸۰- درجه سلسیوس

برای نگهداری طولانی‌مدت جدایه‌ها در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس از محیط کشت حاوی گلیسرول استفاده شد (Arora *et al*., 2013). فریزکردن جدایه‌ها

در لوله‌های استریل دو میلی‌لیتری مخصوص دارای درپوش پیچی (کرایوتیوب) انجام شد.

- شناسایی مولکولی جدایه‌های لاکتیکی

ابتدا استخراج DNA به کمک کیت تجاری (یکتا تجهیز آزما، ایران)، بر اساس دستورالعمل مندرج در کیت انجام شد. جهت شناسایی مولکولی لاکتیک اسید باکتری‌ها به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، DNA استخراج‌شده به کمک آغازگرهای عمومی رفت و برگشت در دستگاه ترموسایکلر تکثیر شدند. از آغازگرهای عمومی رفت و برگشت لاکتیک اسید باکتری‌ها، برای تکثیر نواحی متغیر ۱۶S rDNA استفاده شد (Nasrollahzadeh *et al*., 2019).

- بررسی خصوصیات ضد قارچی جدایه لاکتیکی به‌روش دولایه (Overlay)

ابتدا اسپور کپک‌های *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* در محیط PDA کشت داده شدند و به‌مدت یکتا دو هفته (تا زمان اسپورزایی مناسب) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری گردیدند و سپس به‌وسیله لام هموسایتومتر مقدار 10^4 اسپور از هر کپک برای تلقیح جداسازی و شمارش شد. هم‌چنین لاکتیک اسید باکتری‌ها در محیط کشت MRS مایع به‌مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت در شرایط بی‌هوازی کشت و مورد استفاده قرار گرفتند.

بعد از این‌که باکتری‌ها در محیط مایع رشد کرده و فعال شدند، از کشت فعال باکتریایی با لوپ استریل، ۲ خط سه سانتی‌متری بافاصله دو سانتی‌متر از هم روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شد (مطابق شکل ۱؛ دو خط مشخص در شکل باکتری‌های لاکتیکی کشت داده شده می‌باشند). سپس کشت‌های حاصل به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس برای رشد باکتری‌های لاکتیکی گرمخانه‌گذاری گردیدند و در نهایت ۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA (Merck, Germany) حاوی 10^4 spore/ml از اسپور کپک *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* به سطح پلیتی که جدایه‌های لاکتیکی بر روی آن کشت داده شده بودند، اضافه گردید. برای نمونه کنترل، در یکی از پلیت‌ها هیچ‌گونه جدایه لاکتیکی بر روی محیط کشت داده نشد و فقط سوسپانسون کپکی حاوی 10^4 spore/ml بر روی پلیت ریخته شد. پلیت‌ها به‌مدت یک هفته در ٢٦ درجه سلسیوس و شرایط هوازی گرمخانه‌گذاری شدند و در پایان ٤٨، ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ ساعت، مساحت رشد کپک نسبت به سطح پلیت با کمک نرم‌افزار Image J اندازه‌گیری شد (Magnusson *et al*., 2003).

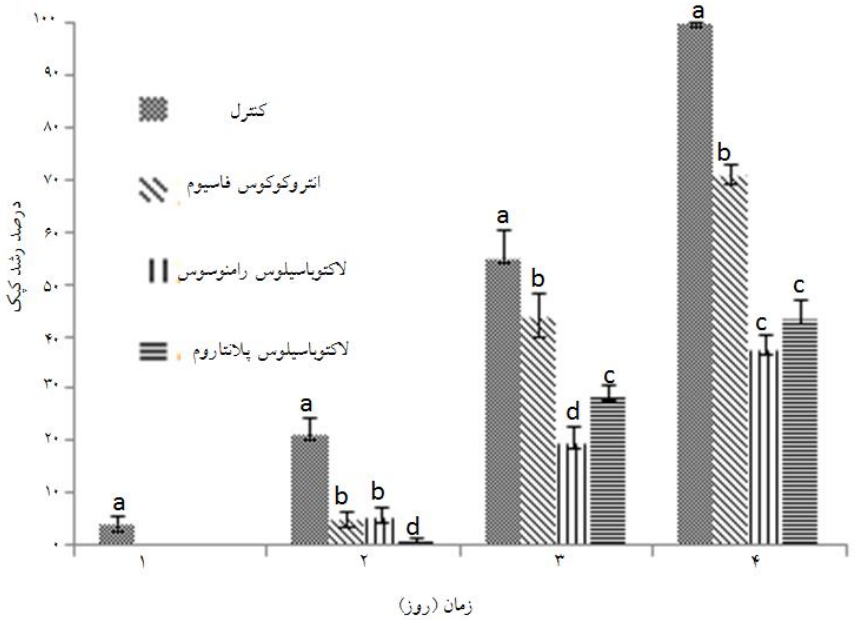
- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج حاصل از این پژوهش نیز با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه و روش حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح احتمال پنج درصد در سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

یافته‌ها

از بین جدایه‌های مورد بررسی، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 (جداشده از کره مسکه) با بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی بر باکتری‌های گرم منفی، *انتروکوکوس فاسیوم* C8 (جداشده از دوغ شتر) با بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی بر *لیستریا مونوسایتوژنز* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y89 (جداشده از ماست محلی) با

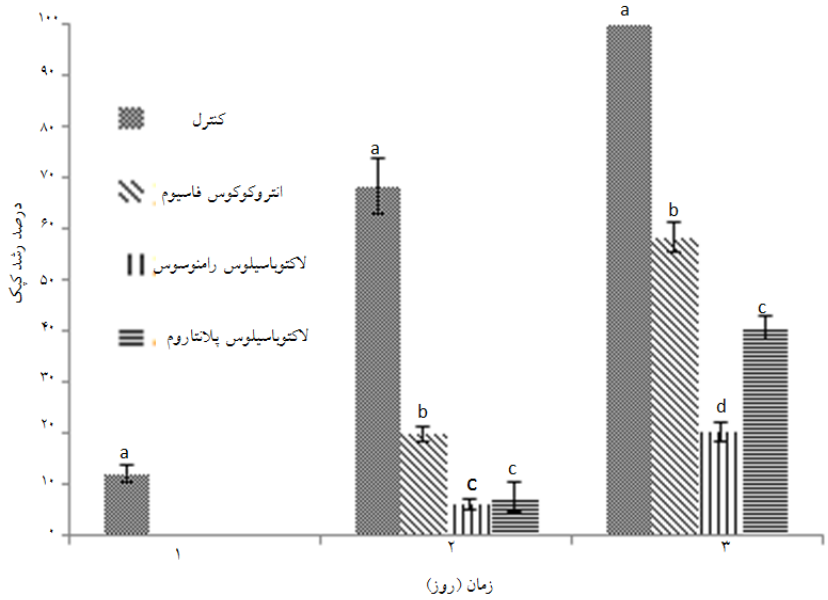
بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی بر *استافیلوکوکوس اورئوس* انتخاب شدند و تأثیر ضدقارچی آن‌ها در برابر کپک‌های توکسین‌زا شامل *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* با استفاده از روش دولایه با ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در نمودار (۱) مشاهده می‌شود کپک *آسپرژیلوس نایجر* در پلیت‌های حاوی جدایه‌های لاکتیکی طی روز اول، هیچ رشدی نشان نداد و میزان رشد این کپک در حضور هر ۳ جدایه لاکتیکی طی روزهای دوم و سوم به‌ترتیب ۵/۵-۱/۰۶ درصد و ۴۳/۸۴-۱۹/۴ درصد و در پلیت کنترل به‌ترتیب ۲۱/۱۶ و ۵۵/۰۷ درصد بود. *آسپرژیلوس نایجر* در پایان روز چهارم به‌طور کامل سطح پلیت کنترل را پوشانده بود ولی مساحت رشد یافته توسط این کپک در حضور جدایه‌های لاکتیکی *انتروکوکوس فاسیوم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در پایان روز چهارم به‌ترتیب ۷۰/۸۴، ۳۷/۶۵ و ۴۳/۳۱ درصد بود و در پایان روز ۵ هیچ‌گونه بازدارندگی مشاهده نگردید. نتایج نشان داد که در طی چهار روز گرمخانه‌گذاری، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به صورت معنی‌داری ($P<$ ۰/۰۵) از بالاترین میزان بازدارندگی بر روی *آسپرژیلوس نایجر* برخوردار بود (شکل ۱).



نمودار (۱) – مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی *آسپرژیلوس نایجر*
$^{a, b, c, d}$ حروف مشابه نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

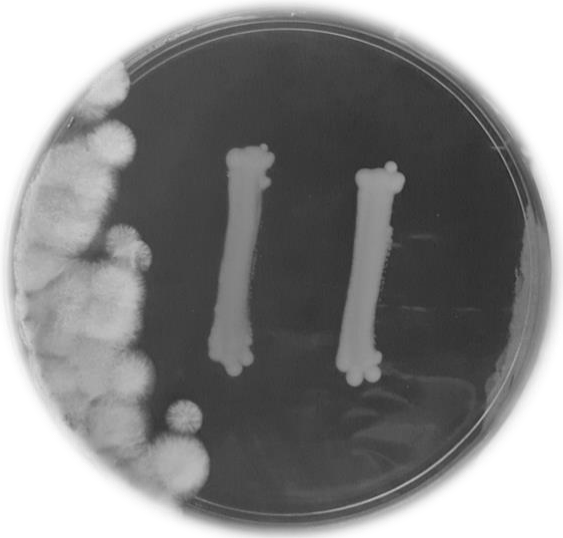
شکل (۱)- تأثیر بازدارندگی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر روی *آسپرژیلوس نایجر* در پایان روز چهارم

نتایج بررسی تأثیر جدایه‌های لاکتیکی بر میزان رشد *آسپرژیلوس فلاوس* (نمودار ۲) نیز نشان داد که تمام باکتری‌های مورد آزمون بر روی کپک مذکور دارای خاصیت بازدارندگی رشد بودند. میزان رشد *آسپرژیلوس فلاوس* در پلیت کنترل طی سه روز به‌ترتیب ۱۲/۰۲، ٦٨/٤ و ۱۰۰ درصد بود ولی در حضور *انتروکوکوس فاسیوم* به‌ترتیب ۰، ۱۹/۸۳ و ۵۸/۳۸ درصد، در حضور *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به‌ترتیب ۰، ٦/۱ و ۲۰/۱۷ درصد و در حضور *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به‌ترتیب ۰، ۷/۵۱ و ٤۰/۸۲ درصد بود و در پایان روز ٤ هیچ‌گونه بازدارندگی مشاهده نگردید. این نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) از بالاترین میزان بازدارندگی در مقابل *آسپرژیلوس فلاوس* برخوردار بود (شکل ۲).



نمودار (۲)- مقایسه میزان بازدارندگی جدایه‌های لاکتیکی بر روی *آسپرژیلوس فلاوس*

$^{a, b, c}$ حروف مشابه نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل (۲)- تأثیر بازدارندگی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر روی *آسپرژیلوس فلاوس* در پایان روز سوم

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y89 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران، توانایی مهار رشد *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* توکسین‌زا را دارند؛ به‌طوری‌که نتایج حاصل از بررسی اثر ضدقارچی نشان داد که کپک *آسپرژیلوس نایجر* در پایان روز چهارم به‌طور کامل سطح پلیت کنترل را پوشانده بود ولی هر سه جدایه لاکتیکی در پایان روز چهارم توانستند به نسبت‌های مختلف (به‌ترتیب ٦٢/٣٥، ٢٩/١٦ و ٥٦/٦٩ درصد) از رشد *آسپرژیلوس نایجر* جلوگیری نمایند. هم‌چنین نتایج بررسی تأثیر جدایه‌های لاکتیکی بر میزان رشد *آسپرژیلوس فلاوس* نیز نشان داد که تمام باکتری‌های لاکتیکی مورد آزمون بر روی کپک مذکور دارای خاصیت بازدارندگی رشد بودند.

در راستای تحقیقات حاضر، محققین دیگری به ارزیابی ویژگی‌های جدایه‌های *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* پرداختند که نتایج آن‌ها نشان‌دهنده طیف وسیع اثرات ضدقارچی این جدایه‌ها در برابر *آسپرژیلوس* بود؛ کاهش معنی‌دار رشد این قارچ، میزان آفلاتوکسین B_1 تولید شده را به‌ترتیب ٩٩/٨–٩٧/٥ درصد و ١٠٠–٢٧/٥ درصد کاهش داد (Gerbaldo *et al*., 2012). اثرات ضدقارچی *لاکتوباسیلوس کورنی‌فورمیس* به اثبات رسیده است (Magnusson and Schnürer., 2001). هم‌چنین جداسازی ٤ جدایه *لاکتوباسیلوس برویس* (KR3، KR4، KR51 و KR53) از محصول تخمیری سنتی بلغارستان (به نام کاتاک) نشان داد که هر چهار جدایه حاصل می‌توانند به‌صورت معنی‌داری از رشد آسپرژیلوس، پنی‌سیلیوم، فوزاریوم و تریکودرما جلوگیری کنند (Tropcheva *et al*., 2014). علاوه بر این در تحقیقات دیگری به اثبات رسیده است که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه 21B، با تولید ترکیبات فنیل لاکتیک اسید و ٤- هیدروکسی فنیل لاکتیک اسید توانایی مهار رشد *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاوس* را دارا می‌باشد (Lavermicocca *et al*., 2003).

بررسی رابطه تولید فنیل‌لاکتیک اسید (یکی از ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده به‌وسیله لاکتیک اسید باکتری‌ها) تولید شده در تخمیر کیمچی به‌وسیله لاکتیک اسید باکتری‌ها نشان داد که بین رشد باکتری و مقدار فنیل‌لاکتیک اسید یک رابطه مستقیم وجود دارد. لذا افزودن باکتری *لاکتوباسیلوس بروبس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به این محصول، تولید فنیل‌لاکتیک اسید را به‌ترتیب ١/٧ و ١/٥ برابر می‌کند. تولید این ماده ضدمیکروب در لاکتیک اسید باکتری‌ها به حضور ژن لاکتات دهیدروژناز نسبت داده شده است (Jung *et al*., 2019). تولید اسیدهای آلی، فنیل لاکتیک اسید، پراکسید هیدروژن، دی استیل و ترکیبات پپتیدی زیست‌فعال از دلایل بروز اثرات ضدقارچی این باکتری‌ها به شمار می‌آید. در برخی منابع نیز فعالیت ضدقارچی لاکتیک اسید باکتری‌ها به اثر سینرژیستی این ترکیبات نسبت داده شده است (Stroem *et al*., 2005). در این مطالعه نیز مطابق با تحقیقات ذکرشده مشخص شد که جدایه‌های لاکتیکی مورد بررسی قادر به جلوگیری از رشد قارچ‌های توکسین‌زا می‌باشند.

به‌طور کلی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مهارکنندگی لاکتیک اسید باکتری‌ها می‌توان به ناپایداری و نفوذپذیری دیواره سلولی، تداخل شیب پروتون، استرس

اکسیداتیو و بازدارندگی آنزیمی اشاره نمود (*et al.*, Siedler 2019). البته تاکنون جزئیات همه این مکانیسم‌ها شناخته نشده است و برخی از آن‌ها هنوز در حال بررسی می‌باشند. بر اساس نتایج این پژوهش، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y89 (جداشده از ماست محلی) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* B38 (جدا شده از کره مسکه)، توانایی برای مهار رشد *آسپرژیلوس فلاوس* و *آسپرژیلوس نایجر* توکسین‌زا را دارند. بنابراین از جدایه‌های لاکتیکی به‌دست آمده از کره مسکه و ماست می‌توان به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی به‌همراه نگه‌دارنده‌های سنتزی به‌منظور کاهش استفاده از آن‌ها استفاده نمود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P. and Ayyash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. LWT - Food Science and Technology, 79: 316–325.
- Ahmadova, A., Todorov, S.D., Hadji-Sfaxi, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Messaoudi, S., et al. (2013). Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. Anaerobe, 20: 42–49.
- Arora, D.K., Das, S. and Sukumar, M. (2013). Analyzing Microbes: Manual of Molecular Biology Techniques. Springer Berlin Heidelberg, pp. 135–152.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods, a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223–253.
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A., and García, H. (2014). Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. International Journal of Food Microbiology, 173: 30–35.
- Dali, D. K. D., Deschamps, A. M. and Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria e potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. Food Control, 21: 370–380.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G. and Le Blay G. (2012). Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures. Food Control, 30: 206–213.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. and Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. International Journal of Food Microbiology, 33(1): 85–102.
- Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L. and Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. Trends in Food Science and Technology, 22: 58–66.
- Gerbaldo, G.A., Barberis, C., Pascual, L., Dalcero, A. and Barberis, L. (2012). Antifungal activity of two Lactobacillus strains with potential probiotic properties. FEMS Microbiology Letters, 332: 27–33.
- Gerez, C., Torres, M., deValdez, G.F. and Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. Biological Control, 64(3): 231–237.
- Guimarães, A., Venancio, A., and Abrunhosa, L. (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. Food Additives and Contaminants: Part A, 35(9): 1803–1818.

- Jung, S., Hwang, H., and Lee, J.H. (2019). Effect of lactic acid bacteria on phenyllactic acid production in kimchi. Food Control, 106, 106701.
- 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. Applied Microbiology, 66: 4084–4090.
- Lavermicocca, P., Valerio, F. and Visconti, A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Applied and Environmental Microbiology, 69: 634–640.
- Leite, A.M.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V.M. F., Mayo, B. and Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. Journal of Dairy Science, 98: 1–11.
- Leroy, F. and De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science and Technology, 15(2): 67–78.
- Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X. et al. (2014). Antifungal activities and effect of Lactobacillus casei AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. Food Control, 43: 57–64.
- Lotfi, H., Hejazi, M. A., Maleki Zanjani, B. and Barzegari A. (2010). Isolation, biochemical and molecular identification of potentiallly probiotic bacteria from traditional dairy products from Heris and Sarab Regions. Journal of Food Research, 1: 1–17. (In Persian)
- Leyva Salas, M., Thierry, A., Lemaître, M., Garric, G., Harel-Oger, M., Chatel, M. and Coton, E. (2018). Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale applications. Frontiers in Microbiology, 9, 1787.
- Lynch, K.M., Pawlowska, A.M., Brosnan, B., Coffey, A., Zannini, E., Furey, A. et al. (2014). Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 34(1): 167–173.
- Magnusson, J. and Schnürer, J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. coryniformis strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Applied and Environmental Microbiology, 67: 1–5.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. and Schnürer, J. (2003). Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 219(1): 129–135.
- Nanda, D.K., Tomar, S.K., Singh, R., Mal, G., Singh, P., Arora, D.K. and Kumar, D. (2011). Phenotypic and genotypic characterisation of Lactobacilli isolated from camel cheese produced in India. International Journal of Dairy Technology, 64(3): 437–443.
- Nasrollahzadeh, A., Khomeiri, M., Sadeghi, A, Mahmudi, M. and Ebrahimi M. (2019). Identification and evaluation of the antimicrobial potential of strains derived from traditional fermented dairy products of Iran as a biological preservative against *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. Pathogens, 8(2): 71–91.
- 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 Microbiology, 37: 78–95.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. CA: A Cancer Journal for Clinicians Cancer, 55: 74–108.
- Pawlowska, A.M., Zannini, E., Coffey, A. and Arendt, E.K. (2012). "Green Preservatives": combating fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria. Advances in Food and Nutrition Research, 66: 66: 217–238.
- Rossetti, L. and Giraffa, G. (2005). Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. Journal of Microbiological Methods, 63(2): 135-144.

- Rouse, S., Harnett, D., Vaughan, A. and Sinderen D. (2008). Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. Journal of Applied Microbiology, 104(3): 915–923.
- Schnürer, J. and Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trends in Food Science and Technology, 16(1): 70–78.
- Sengun, I., Yaman, D. and Gonul, S. (2008). Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. World Mycotoxin Journal, 1(3): 291–298.
- Siedler, S., Balti, R. and Neves, A.R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. Current Opinion in Biotechnology, 56: 138-146.
- Stroem, K., Schnuerer, J. and Melin P. (2005). Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. FEMS Microbiology Letters, 246: 119–124.
- 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.
- Yang, E. and Chang, H. (2010). Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. International Journal of Food Microbiology, 139(1): 56–63.
- Zhang, J., Wang, X. J., Yan, Y.J., Jiang, L., Wang, J.D., Li B.J. et al. (2010). Isolation and identification of 5-hydroxyl-5-methyl-2-hexenoic acid from Actinoplanes sp. HBDN08 with antifungal activity. Bioresource Technology, 101(21): 8383–8388.