نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۵۲-۴۳۸

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 438-452

بررسی فعالیت‌های ضدمیکروبی فلور لاکتیکی جدا شده از مراحل تولید کره مسکه علیه باکتری‌های شاخص مواد غذایی

محمد رضا عدالتیان دوم[1*]، مسعود یاورمنش[2]، فریبا قیامتی یزدی[3]، مرتضی خمیری[4]، ندا نیری[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۳/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۸/۱۴

چکیده

فعالیت بازدارندگی ۵۱ جدایه باکتری اسیدلاکتیک بدست آمده از شیر گوسفند، ماست گوسفندی و کره محلی مسکه در مقابل میکروارگانیسم‌های شاخص بیماری‌زا شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی*، *لیستریا اینوکوا* و غیر بیماری‌زا از جمله: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس ساکی*، *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه لاکتیس* و *لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس* مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت. از میان ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک، ۴۴ ایزوله در روش نقطه‌گذاری در برابر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص، خاصیت بازدارندگی از خود نشان دادند. در حالیکه در روش نفوذ در چاهک، این تعداد به ۳۹ ایزوله کاهش یافت. در این مرحله، ۸ ایزوله که شامل گونه‌های *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (۱ ایزوله)، *انتروکوکوس فاسیوم* (۱ ایزوله)، *انتروکوکوس دورانس* (۱ ایزوله) و *آئروکوکوس ویریدنس* (۵ ایزوله) بودند بیشترین اثر آنتاگونیستی را بر باکتری شاخص *لیستریا اینوکووا* نشان دادند. از این بین، فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت یک ایزوله *آئروکوکوس ویریدانس* دارای بالاترین مقاومت حرارتی بود. همچنین دو ایزوله *آئروکوکوس ویریدانس*، فعالیت ضدمیکروبی خود را در pHخنثی حفظ کرده بودند. فقط فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت دو ایزوله شامل *انتروکوکوس فاسیوم* و *آئروکوکوس ویریدنس*، تحت تاثیر آنزیم پروتیئناز K قرار نگرفت. تمام این خصوصیات فیزیکوشیمیایی جالب، اجازه می‌دهد که عصاره فاقد سلول (سوپرناتانت) برخی از ایزوله‌های مذکور، بعنوان نگهدارنده بیولوژیکی در مواد غذایی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اسید لاکتیک، خواص بازدارندگی، باکتریوسین، روش نقطه‌گذاری،روش نفوذ در چاهک

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند که ویژگی‌های مورفولوژیکی، متابولیکی و فیزیولوژیکی خاص خود را دارند (Savijoki *et al*., 2006). علاوه بر آن، باکتری‌های اسیدلاکتیک، یک منبع با ارزش از عوامل ضد میکروبی، از جمله باکتریوسین‌ها بشمار می‌آیند (Cotter, *et al*., 2005). باکتریوسین‌ها، پپتیدهای غیرسمی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که دارای فعالیت ضدمیکروبی بوده و به اسید و گرما مقاوم و به سهولت هضم می‌شوند. باکتریوسین می‌تواند ابزاری برای بهبود امنیت و کیفیت غذاهای تخمیر شده باشد.

باکتریوسین بصورت یک ماده افزودنی در غذاها می‌تواند از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و اسپورهای آن‌ها جلوگیری کند. در کشورهای صنعتی، این روش‌ها در مقایسه با کاربرد باکتریوسی‌ها یا سایر محافظت‌کننده‌ها، به میزان کمتری مورد استفاده قرار گرفته است و ممکن است بعنوان روشی جایگزین برای بهبود محافظت از غذاها در محیط بکار گرفته شود و منجر به کاهش مسمومیت در غذاهای تخمیری شود (Chen, 2003؛ Guinane, 2005؛ Nandakumar,1999 ؛ Olasapo, 1999).

باکتریوسین‌ها بر اساس خواص بیوشیمیایی و ویژگی‌های ژنتیکی به ۳ گروه اصلی طبقه بندی می‌شود:

گروه اول: لنتی بیوتیک‌ها[2]: پپتیدهای کوچک و مقاوم به گرما هستند و در ساختمان خود اسیدهای آمینه لانتیونین[3] ومتیل

۱، ۲ و ۵- استادیاران و دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشجوی دکتری گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه صنعتی اصفهان
۴- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(* - نویسنده مسئول: Email:edalatian@um.ac.ir)

2 Lantibiotics
3 Lanthionin

لانتیونین[1] دارند. لنتی‌بیوتیک به دو زیر گروه تقسیم می‌شوند. زیر گروه اول که دارای ساختمان کشیده و انعطاف پذیر بوده و دارای بار مثبت است که با ایجاد منفذ در ساختمان غشاء در گونه‌های هدف، باعث افزایش نفوذپذیری آنها می‌شود. باکتریوسین نایسین[2] عضوی از این گروه است که توسط *Lactococcuslactissubsp. lactis* تولید می‌شود. نایسین در ابتدا بصورت پری‌نایسین تولید می‌شود که دارای ۵۷ اسیدآمینه است. سپس تغییراتی در اسیدآمینه‌های آن بوجود آمده که به پرونایسین تبدیل می‌شود و در نهایت با خروج ۲۳ اسید آمینه به نایسین فعال با ۳۴ اسیدآمینه مبدل می‌شود. زیر گروه دوم، پپتیدهای کروی و دارای ساختمان سفت و محکم و دارای بار منفی یا خنثی هستند. آن‌ها در واکنش‌های آنزیمی ضروری و حساس باکتری‌ها مداخله می‌کنند (Riley& Chavan, 2007).

گروه دوم: باکتریوسین‌های با وزن‌های مولکولی متغیر اما معمولا کوچک، مقاوم به گرما و دارای اسیدآمینه‌های منظم هستند. این گروه به ۳ زیر گروه تقسیم می‌شود. زیر گروه اول شامل پپتیدهای فعال در مقابل لیستریا[3] است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان پدیوسین پی آ–۱[4] و ساکاسین پی[5] را نام برد. زیر گروه دوم شامل دو پپتید مکمل می‌باشد که شامل لاکتوکوکسین جی[6]، پلانتاریسین جی کی[7] و پلانتاریسین ای اف[8] است. زیر گروه سوم شامل پپتیدهای کوچک و مقاوم به حرارت است که بوسیله پپتید رهبر انتقال پیدا می‌کنند. باکتریوسین‌های دایورجیسین آ[9] واسیدوسین بی[10] در این گروه قرار دارند (Riley& Chavan, 2007).

گروه سوم: پپتیدهای بزرگ با وزن مولکولی بالای ۳۰ کیلودالتون هستند. در این گروه باکتریوسین‌های هلوتیسینجی[11]، هلوتیسین وی[12]، اسیدوفیلیسین آ[13]، لاکتاسین آ[14] و لاکتاسین بی[15] جای می‌گیرند (Riley& Chavan, 2007).

در فراورده‌های لبنی محلی مانند پنیر و کره‌ی محلی، که فلور میکروبی آن بطور طبیعی ایجاد می‌شود، باکتری‌های ایزوله شده، عموما متعلق به جنس‌های *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *پدیوکوکوس*، *استرپتوکوکوس* و *انتروکوکوس* می‌باشند. باکتری‌های اسیدلاکتیک در بین فلور میکروبی کره بسیار حائز اهمیت بوده و در واقع میکروارگانسیم‌های ذاتی و طبیعی کره‌های محلی بوده‌اند. هریک از جنس‌های این خانواده می‌توانند تاثیر خاصی بر روی ویژگی‌های کره داشته باشند (Idoul, &Karam, 2008).

کره مسکه، به محصولی اطلاق می‌شود که از چربی ماست، پس از انجام عملیات تلمبزنی گرفته می‌شود. شیر گوسفند یا گاو تحت فرایند حرارتی ملایم و فرایندهای تخمیری به ماست تبدیل می‌شود سپس ماست بدست آمده را درون ماستزن‌های دستی یا تلمب‌های پوستی ریخته و پس از طی زمان تلمب زنی، ماست دو فاز شده و فاز کره‌ای روی سطح قرار گرفته جدا می‌شود. تحقیقات زیادی بر روی محصولات محلی انجام پذیرفته و باکتری‌های اسیدلاکتیک با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت سنتی و مدرن (مولکولی) مورد بررسی و شناسایی قرار گرفته‌اند. عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱)، با استفاده از نتایج حاصل از توالی‌یابی ژن16S rRNA ریبوزومی به بررسی و شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در پنیر لیقوان پرداختند. آن‌ها توانستند جنس‌های *انتروکوکوس*، *لاکتوکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* را در پنیر لیقوان (از مرحله شیر تا تولید پنیررسیده) شناسایی کنند. Rodriguez و Gonzalez (۲۰۰۶) بر روی تنوع باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیک اسید ایزوله شده از شیر خام، تحقیق نمودند. باکتری‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین، از ۲۸۹ نمونه شیر گوسفند، گاو و بز، ایزوله شدند. ۸۲ باکتری تولیدکننده باکتریوسین، از لحاظ فنوتیپی و ژنوتیپی، شناسایی شدند.

عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲)، مطالعه‌ای بر روی خواص باکتریوسین‌های باکتری‌های انتروکوکوس (انتروسین) ایزوله شده از پنیرهای سنتی ایرانی (لیقوان و کوزه) انجام دادند. در این بررسی مشخص شد از تعداد ۹۶ ایزوله انتروکوکوس، تعداد ۴۸ ایزوله، اثر بازدارندگی را بر روی حداقل یک باکتری شاخص در روش نقطه‌گذاری[16] نشان دادند. که از این تعداد، ۲۰ ایزوله مطابق با ۱۵ سویه مختلف، در محیط کشت مایع در روش نفوذ در چاهک[17]، مشخص شد که ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید می‌کنند.

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مختلفی بر ترکیبات باکتریوسینی تولید شده توسط فلور لاکتیکی موجود در این محصول، موثر می‌باشند. از جمله‌ی این فاکتورهای فیزیکوشیمیایی می‌توان به اثر درجه حرارت و سطوح pH مختلف و آنزیم پروتئیناز K بر مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی شبه باکتریوسینی اشاره نمود. بر این اساس khay و همکاران (۲۰۱۱) بر روی فعالیت‌های ضدمیکروبی ترکیبات

1Methyllanthionine
2Nisin
3Listeria
4Pediocin PA-1
5Sakacin P
6Lactococcin G
7Plantaricins JK
8Plantaricins EF
9Divergicin A
10Acidocin B
11Helveticins J
12Helveticins V
13Acidofilicin A
14Lactacins A
15Lactacins B

16Agar Spot
15Agar Well Diffusion Assay

شبه باکتریوسینی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از شیر پژوهش نمودند و در این پژوهش، حساسیت این ترکیبات با قرار دادن سوپرناتانت فاقد سلولی در معرض سه حرارت، پنج pH و شش آنزیم مختلف از جمله تریپسین و پاپایین سنجیده شد.همچنین Cardoso و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ترکیبات شبه باکتریوسینی *Enterococcus faecalis* در برابر باکتری‌های گرم منفی، کپک‌ها و مخمرها پژوهش نموده و تاثیر سه فاکتور درجه حرارت، pH و آنزیم‌های مختلف را بر این ترکیبات بررسی نمودند.

هدف اصلی از انجام این تحقیق، پس از جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک از شیر گوسفند، ماست و کره محلی مسکه حاصل از آن، بررسی تاثیر ترکیبات ضدمیکروبی شبه باکتریوسینی توسط فلور لاکتیکی بر روی باکتری‌های شاخص بیماری‌زا شامل: *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کلی* و *لیستریا اینوکوا* توسط روش‌های مبتنی بر کشت (نقطه‌گذاری و نفوذ در چاهک) و سپس بررسی اثر برخی فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مانند درجه حرارت‌های مختلف، سطوح pH مختلف و اثر آنزیم پروتئیناز K بر روی مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی شبه باکتریوسینی بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه های لبنی

سه نمونه شیر، سه نمونه ماست و سه نمونه کره محلی مسکه حاصله از آن‌ها، از تولیدکنندگان محلی در مناطق مختلف گناباد (در جنوب خراسان رضوی) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها مخصوصاً از مناطقی که بطور سنتی، سال‌های زیادی است که به تولید کره محلی مسکه مشغول هستند، جمع‌آوری گردید همه نمونه‌ها از شیر گوسفند تهیه شده و مربوط به شهرستان‌های ریاب (جنوب غربی گناباد)، بیمرغ (شرق گناباد)، برجوک (جنوب شرقی گناباد) و بند ازبک (شرق گناباد) بود. نمونه‌ها از بچ‌های مختلف که در ماه‌های مختلف سال (بهمن تا خرداد) تولید شده‌اند، جمع‌آوری شده و در کیسه‌های استریل در ۴°C به آزمایشگاه انتقال یافت و کلیه آزمون‌های مربوطه ظرف ۲۴ ساعت آینده انجام پذیرفت.

میکروارگانیسم‌های شاخص و شرایط کشت

همانطور که در جدول ۱، مشاهده می‌شود، جهت بدست آوردن کشت فعال از میکروارگانیسم‌های شاخص، پس از کشت بر روی محیط مناسب، به مدت ۲۴ ساعت (به استثناء *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* به مدت ۷۲ ساعت)، در دمای مربوطه گرمخانه‌گذاری شد.

جدول ۱- میکروارگانیسم‌های شاخص و شرایط کشت

شماره	میکروارگانیسم شاخص	شرایط رشد
۱	*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)	Tripticase Soy Agar (TSA)-37°C-liofilchem-Italy
۲	*Listeria innocoa* (ATCC33090)	Tripticase Soy Agar (TSA)-37°C
۳	*E.coli* (ATCC 25922)	Tripticase Soy Agar (TSA)-30°C
۴	*Lactobacillus sakei* (ATCC15521)	DeMan Rogosaand Sharpe (MRS - Merk- Germany)-37°C
۵	*Lactobacillus plantarum* (ATCC8014)	DeMan Rogosaand Sharpe (MRS)-37°C
۶	*Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* (ATCC 11454)	M17+1% lactose-Fluka- USA-30°C
۷	*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*(ATCC 19275)	M17+1% lactose-30°C

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک

نمونه‌های شیر و ماست (۱۰ میلی‌لیتر) در ۹۰ میلی‌لیتر محلول NaCl ۰/۸۵ وزنی- حجمی (Merk, Germany) هموژنیزه شده و پس از آن رقیق‌سازی سریالی در محلول نمکی ذکر شده انجام پذیرفت. برای نمونه‌های مسکه، ۲۵ گرم کره محلی در ۲۲۵ میلی‌لیتر محلول تری سدیم فسفات ۲٪ وزنی- حجمی (pH=۷/۵) (Merk, Germany) همگن شده و تا ۴۰°C بتدریج گرم شد و سپس رقیق‌سازی سریالی توسط آب پپتونه ۱٪ (Merk, Germany) انجام شد. مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول‌های رقیق‌سازی شده، در دو تکرار بر روی محیط‌های کشت مناسب کشت سطحی داده شد و جداسازی باکتریایی انجام شد (Schleifer, 1985-1987؛ Van Hoorde, 2008). بمنظور تایید گونه‌های جداسازی شده، با استفاده از روش‌های مولکولی شامل استخراج DNA، انجام PCR با برنامه دمایی بصورت ذیل:

فعال‌سازی: دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل

واسرشته‌سازی: دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه(دناتوراسیون)

اتصال پرایمر:دمای ۵۴°C به مدت ۳۰ ثانیه

توسعه: دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۳ سیکل

توسعه نهایی: دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل.

برای مشاهده نتایج واکنش PCR پس از بارگذاری واکنش‌های PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪، الکتروفورز با ولتاژ ۸۰ ولت و زمان ۳۵ دقیقه انجام شد و با پرایمرهای یونیورسال از ناحیه ژن 16S rRNA

پرایمر پیش‌رو: (5´-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3´) 27FYM وپرایمر معکوس: (5´-GGTTACCTT GTTACGACTT-3´) 1492R و توالی‌یابی محصولات حاصل از تکثیر، ایزوله‌ها تا مرحله گونه و زیرگونه با دقت بیشتر شناسایی شدند (Alegría, *et al*., 2009).

پایش فعالیت‌های ضدمیکروبی

تکنیک نقطه‌گذاری

فعالیت آنتاگونیستی تمامی ایزوله‌ها در محیط کشت جامد با توجه به روش اصلاح شده Fleming و همکاران (۱۹۸۵) صورت پذیرفت. بطور خلاصه، میزان ۵ میکرولیتر از کشت یک شبه ایزوله‌ها بر روی سطح پلیت‌های حاوی BHI agar اصلاح شده (BHI به همراه ۰/۲ درصد گلوکز) نقطه‌گذاری گردید و سپس در دمای ۳۲ °C به مدت ۲۴ ساعت، جهت رشد و توسعه نقطه‌ها ، گرمخانه‌گذاری شد. سپس، نقاط مزبور با ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آگار نرم (۰/۷۵درصد) مطابق با هر باکتری شاخص تلقیح شده به میزان ۰/۲۵ درصد با باکتری شاخص، پوشیده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط دمایی مورد نیاز هر باکتری شاخص گرمخانه‌گذاری شدند. در نهایت، پلیت‌ها جهت هاله شفاف حاصل از بازدارندگی در اطراف نقاط بررسی و کنترل گردیدند.

تکنیک نفوذ در چاهک

سویه‌های مثبت، در آزمون نقطه‌گذاری، جهت فعالیت ضدمیکروبی در یک آزمون نفوذ در چاهک، مورد بررسی قرار گرفتند. بطور خلاصه، کشت‌های یک شبه از باکتری‌های شاخص جهت تلقیح (به میزان ۱٪) به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت آگار مربوطه در دمای ۴۵°C استفاده شدند. سپس، محیط کشت‌های تلقیح شده داخل پلیت‌ها ریخته شد و بعد از جامد شدن، تعداد ۶ تا ۷ چاهک در هر پلیت ایجاد گردید. بعد از آن، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت خنثی شده (pH= ۶/۵ -۷) و استریل شده با فیلتر غشایی (0.2 µm pore membrane; Millipore, Bedford, MA, USA) حاصل از سویه‌های مولد ترکیبات ضدمیکروبی رشد کرده در BHI در داخل این چاهک‌ها ریخته شد. تمامی پلیت‌ها در شرایط دمایی مناسب گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از آن ایجاد هاله حاصل از ممانعت در اطراف چاهک‌ها بررسی گردید (عدالتیان و همکاران، ۲۰۱۲).

بررسی طبیعت ترکیبات ضدمیکروبی

تاثیر آنزیم پروتئیناز K بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

بمنظور بررسی حساسیت آنزیمی ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، سوپرناتانت فاقد سلول توسط آنزیم پروتئیناز k (Sigma Aldrich, USA)، در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر مورد تیمار قرار گرفت. مخلوط واکنش آنزیم- سوپرناتانت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. فعالیت بازدارندگی باقی مانده توسط تکنیک نفوذ در چاهک مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کنترلی (محیط کشت استریل و آنزیم در غلظت ذکر شده) آماده شدند. همچنین سوپرناتانت تیمار نشده (Untreated CFS) ایزوله‌ها نیز برای مقایسه اندازه قطر هاله بازدارندگی، در کنار سوپرناتانت‌های تیمار شده با آنزیم پروتئیناز K ، قرار گرفتند (Cardoso, *et al*., 2012).

تاثیر دماهای مختلف بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی به حرارت توسط قرار دادن سوپرناتانت فاقد سلول هر جدایه در حرارت‌های ۳۰ °C به مدت ۹۰ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰°C به مدت ۱۵ دقیقه و بالاخره توسط اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ دقیقه سنجیده شد. پس از آن، فعالیت‌های ضدمیکروبی توسط روش AWDA مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های کنترل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند (Cardoso, *et al*., 2012).

تاثیر سطوح مختلف pH بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

بمنظور بررسی مقاومت ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر سطوح مختلف pH، عصاره فاقد سلول در pHهای ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ توسط HCl و NaOH نرمال، تنظیم شد و اثرات بازدارندگی آن توسط تکنیک AWDA مورد ارزیابی قرار گرفت (Lou, *et al*., 2011؛ Cardoso, *et al*., 2012).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح آماری بکار رفته، طرح کاملاً تصادفی باآزمون فاکتوریل بود. بطوریکه متغیرها عبارت بودند از : pH در ۵ سطح (۳، ۵، ۷ و ۱۱)؛ در جه حرارت در ۴ سطح (حرارت‌های ۳۰°C به مدت ۹۰ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰°C به مدت ۱۵ دقیقه و بالاخره توسط اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ دقیقه) و اثر آنزیم پروتیناز K در یک سطح (در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر). تمامی آزمایش‌ها در دو تکرار انجام شد.میانگین و انحراف معیار با کمک نرم افزار Excel محاسبه گردید.آنالیز داده‌ها با نرم افزار Minitab 16 و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار MSTATC با آزمون LSD صورت گرفت و سطح معنی‌داری داده‌ها ۵٪ =α بود.

نتایج و بحث

پس از انجام مراحل توالییابی از میان ۵۱ ایزوله جدا شده از مراحل مختلف تولید کره مسکه، جنس و گونه‌های ذیل به ترتیب

فراوانی شناسایی شدند: *Ent. hirae*،*Ent. durans*،*Ent. faecium* و*Ent. Lactis* (۱۶)، *لئروکوکوس (ویریدنس و یورینه ایکو)* (۱۳)، *Streptococcus thermophilus* (۱۱)، *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* (۷)، *Leuconostoc mesenteroides* (۳)، *Lac. Lactis* (۱). نتایج جدول ۲، نشان می‌دهد از میان ۵۱ ایزوله، ۴۴ ایزوله بر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص (اعم از باکتری‌های شاخص بیماری‌زا و یا غیر بیماری‌زا) موثر بوده است. بطور دقیق‌تر، مشخص گردید که باکتری *E. coli* توسط ۳۳ ایزوله، باکتری *Staph. Aureus* توسط ۷ ایزوله، *Listeria. innocoa* توسط ۱۱ ایزوله، *Lb. plantarum* توسط ۱۲ ایزوله، *Lb. sake* توسط ۷ ایزوله، *Lac. Lactis* ssp.*lactis* توسط ۳۵ ایزوله و در نهایت *Lac. lactis*ssp. *cremoris* توسط ۷ ایزوله ممانعت گردیدند. همانطور که ملاحظه می‌شود و از نتایج بر می‌آید در بین باکتری‌های شاخص بیماری‌زا، باکتری*E.coli*، بیشتر از بقیه تحت تاثیر واقع شدند و در بین باکتری‌های شاخص غیربیماری‌زا یا همان باکتری‌های شاخص اسید لاکتیک، *Lac. lactis* ssp.*lactis* توسط بیشتر ایزوله‌ها ممانعت شدند.

جدول۲- قطر هاله بازدارندگی حاصل از آزمون Agar Spot

شماره	×کد باکتری	نام باکتری	باکتری‌های شاخص					
			E. coli	***Staph. aureus***	***Listeria. innocoa***	***Lb. plantarum***	***Lb. sake***	***Lac. lactis ssp.lactis***	***Lac. lactis ssp. cremoris***
۱	B170	*Str.thermophilus*	+*	-	+	+	−	+	-
۲	B164	*Ent. faecium*	+	+	-	+	-	+	-
۳	M55	*Leu.mesenteroides*	+	-	-	-	-	-	-
۴	M263	*Ent.lactis*	+	-	-	-	-	+	-
۵	Y11	*Ent. durans*	+	-	+	+	-	+	-
۶	M23	*Leu.mesenteroides*	-	-	-	-	-	+	-
۷	M268	*Leu.mesenteroides*	-	-	+	-	-	+	-
۸	M234	*Ent. hirae*	+	-	-	-	-	+	+
۹	M8	*Lac. lactis*	-	−/+	-	-	−	+	−
۱۰	M235	*Ent. faecium*	+	−	−	−	−	+	−
۱۱	B161	*Ent. faecium*	-	-	++++	−	+	+	+
۱۲	M254	*Ent. faecium*	+	-	+	−	−	+	−
۱۳	M142	*Ent. durans*	-	-	-	−	−	+	−
۱۴	M245	*Ent. durans*	+	-	+	−	−	+	−
۱۵	M182	*Ent. faecium*	+	−	+	−	−	+	−
۱۶	Y4	*Ent. faecium*	−	−	−	−	−	+	−
۱۷	B258	*Str.thermophilus*	+	-	+++++	−	−	−	−
۱۸	M220	*Ent. faecium*	+	−	−	−	−	+	−
۱۹	M14	*Ent. faecium*	+	−	−	+	+	+	−
۲۰	Y106	*Str.thermophilus*	+	+	-	−	−	−	−
۲۱	M256	*Ent. durans*	+	+	-	−	−	+	−
۲۲	B66	*Lb. fermentum*	+	+	-	−	−	+	−
۲۳	Y109	*Str.thermophilus*	+	-	-	−	−	−	−
۲۴	M143	*Aerococcus viridians*	−	−	−	−	−	+	−
۲۵	M24	*Ent. hirae*	+	−	−	+	+	+	−
۲۶	B227	*Aerococcus viridians*	+	-	-	−	−	−	−
۲۷	M165	*Aerococcus viridians*	+	+	-	−	−	+	−
۲۸	M171	*Aerococcus viridians*	+	−	−	−	−	+	−

۲۹	M141	*Aerococcus viridians*	−	−	−	−	−	+	−
۳۰	M156	*Aerococcus viridians*	+	-	-	−	−	+	−
۳۱	M237	*Ent. faecium*	+	-	-	−	−	−/+	+
۳۲	M238	*Ent. faecium*	+	-	-	−	−	+	+
۳۳	M11	*Ent. faecium*	+	-	-	+	−	+	+
۳۴	M256	*Ent. faecium*	+	−	−	−	−	+	+
۳۵	B120	*Lb. plantarum*	+	+	+	++	++	−	++
۳۶	M101	*Aerococcus viridians*	-	-	+	−	−	−	−
۳۷	M109	*Aerococcus urineke*	-	-	+	−	−	−	−
۳۸	B23	*Lb. fermentum*	-	-	-	+	+	+	−
۳۹	B35	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	+	+	+	−
۴۰	B37	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	−	+	+	−
۴۱	B38	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	+	−	+	−
۴۲	B39	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+	-	-	−	−	−	−
۴۳	Y19	*Str.thermophilus*	+	-	-	+	−	+	−
۴۴	Y75	*Str.thermophilus*	+	-	-	+	−	+	−

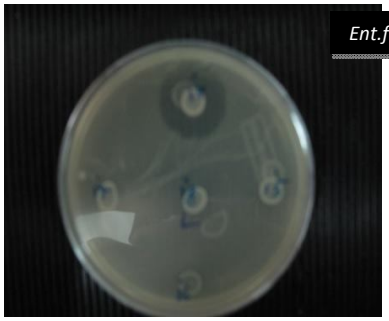
* تعداد علامت‌های مثبت، بیانگر قطر هاله بزرگتر و در نتیجه مبین قدرت بازدارندگی بیشتر ایزوله می‌باشد. علامت منفی، مشخص‌کننده عدم تولید هاله شفاف می‌باشد.

× کد باکتری ، مخفف مراحل تولید کره مسکه است. M(Milk) مرحله شیر، B (Butter) مرحله تولید کره و Y (Yoghurt) مرحله تولید ماست.

کدهای B260 (*Str.thermophilus*)، B272 (*Str.thermophilus*)B259،(*Str.thermophilus*) B251، (*Str.thermophilus*)، M181 (*Aerococcusviridians*)M112،(*Aerococcusviridians*)، Y73 (*Str.thermophilus*).

بر روی هیچ یک از باکتری‌های شاخص تاثیر ضد میکروبی نداشتند بنابراین در جدول آورده نشدند.

اما از میان ایزوله‌های اسید لاکتیک، دو ایزوله *Ent. Faecium* کد B161 و *Str.thermophilus* کد B258 بیشترین اثر بازدارندگی یا قطر هاله حاصل از بازدارندگی را روی باکتری شاخص *Listeria. Innocoa* نشان دادند. شکل ۱، هاله شفاف حاصل از بازدارندگی ایزوله *Ent. faecium* بر روی باکتری *Listeria. Innocoa* را نشان می‌دهد. نکته جالب و قابل توجه اینکه، هر دو سویه مورد نظر از کره مسکه ، ایزوله شده بودند، که نشان‌دهنده این حقیقت است که منشاء اولیه هر دو سویه احتمالاً یکی بوده است.



شکل۱- هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *Ent. Faecium* بر روی باکتری شاخص *Listeria. innocoa*.

دلیل تشکیل هاله شفاف در روش نقطه‌گذاری، را می‌توان علاوه بر باکتریوسین یا ترکیبات شبه باکتریوسین ، بحضور ترکیبات ضدمیکروبی وابسته به کلونی[1] از قبیل وجود پراکسید هیدروژن ، اسید لاکتیک یا سایر اسیدهای ارگانیک نسبت داد (Alegría, *et al*., 2009). در تحقیق دیگر توسط عدالتیان و همکاران (۲۰۱۲) که بر روی انتروکوکوس‌های ایزوله شده از پنیرهای سنتی ایران صورت گرفته بود، مشاهده کرد که در روش نقطه‌گذاری، از بین ۹۶ ایزوله، ۴۸ ایزوله انتروکوکوس روی حداقل یکی از باکتری‌های شاخص اثر بازدارندگی داشته است. این امر نشان‌دهنده قدرت و پتانسیل بالای باکتری‌های جنس انتروکوکوس، در ممانعت‌کنندگی باکتری‌های شاخص می‌باشد. همینطور بصورت مشابه ملاحظه گردید، که بیشترین قطر هاله بازدارندگی ایزوله‌ها بر روی شاخص *Listeria. Innocoa* می‌باشد که با نتایج حاصله از این تحقیق نیز مطابقت و هماهنگی دارد. در این راستا، محققان زیادی اثر ضدلیستریایی باکتری‌های اسید لاکتیک بویژه جنس انتروکوکوس را نشان داده بودند.یکی از قابل توجه‌ترین خصوصیات بسیاری از باکتریوسین‌های انتروکوکال فعالیت بازدارندگی بسیار ویژه و خیلی قوی آنها در برابر

1 Colony associated antimicrobial compounds

لیستریا می باشد (Parente & Hill, 1992). کنترل گونه‌های جنس لیستریا، یک دغدغه جدی در ایمنی مواد غذایی است چرا که این پاتوژن می‌تواند در اکثر مواد غذایی وجود داشته باشد(Muriana, 1996). نکته قابل تامل دیگری که از جدول ۲ قابل دریافت است، وجود باکتری *Lb.plantarum* کدB120 است، که روی ۶ باکتری شاخص از ۷ باکتری شاخص، اثر بازدارندگی داشته است. این باکتری از مرحله کره مسکه ایزوله شده است و فقط روی باکتری شاخص *Lac. lactis* ssp.*lactis* تاثیری نداشته است. از آنجا که ایجاد هاله شفاف بازدارندگی ممکن است به دلایل دیگری غیر از تولید ترکیبات شبه باکتریوسین باشد از قبیل پراکسید هیدروژن و یا اسیدهای ارگانیک مانند اسید لاکتیک، بنابراین نمی‌توان بطور قطع بر اساس نتایج حاصل از آزمون نقطه‌گذاری قضاوت نهایی را انجام داد، لذا تمام ایزوله‌های مورد بررسی (۵۱ ایزوله) اعم از ایزوله‌هایی که در روش نقطه‌گذاری مثبت بودند و آن ایزوله‌هایی که منفی بودند، در قالب آزمون نفوذ در چاهک، مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون سوپرناتانت یا عصاره فاقد سلول باکتری‌ها FreeSupernatant Cell (CFS) از نظر قدرت ممانعت‌کنندگی یا تولید هاله شفاف بر روی باکتری‌های شاخص مورد بررسی قرار گرفتند. جدول ۳، نتایج حاصل از آزمون نفوذ در چاهک را برای ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک و بر روی ۷ باکتری شاخص (بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا) نشان می‌دهد.

جدول۳- قطر هاله بازدارندگی حاصل از آزمون نفوذ در چاهک

شماره	*کد باکتری	نام باکتری	باکتری های شاخص						
			E. coli	*Staph. aureus*	*Listeria. innocoa*	*Lb. plantarum*	*Lb. sake*	*Lac. lactis ssp.lactis*	*Lac.lactis ssp. cremoris*
۱	B170	*Str.thermophilus*	−	−	++	+	−	−	−
۲	B164	*Ent. faecium*	−	−	++	+	−	−	−
۳	M263	*Ent.lactis*	+weak	−	−	++	−	−	−
۴	Y11	*Ent. durans*	−	−	++	+	−	−	−
۵	M234	*Ent. hirae*	−	−	−	−	−	−	+
۶	B260	*Str. thermophilus*	+ weak	−	−	+	−	+	−
۷	M8	*Lac. lactis*	+ weak	−	−	+	−	+	−
۸	M235	*Ent. faecium*	−	−	−	+	−	−	−
۹	B161	*Ent. faecium*	−	−	−	−	−	−	+
۱۰	M254	*Ent. faecium*	−	−	−	weak +	-	-	+
۱۱	M142	*Ent. durans*	+ weak	−	−	weak +	+	-	-
۱۲	M182	*Ent. faecium*	−	−	−	weak +	+	-	+
۱۳	Y4	*Ent. faecium*	−	+	−	weak +	-	+	-
۱۴	B251	*Str.thermophilus*	−	−	−	-	-	-	+
۱۵	M220	*Ent. faecium*	+ weak	−	−	-	+	+	+
۱۶	M14	*Ent. faecium*	+ weak	−	−	+	+	-	+
۱۷	Y106	*Str.thermophilus*	−	−	−	-	-	+	+
۱۸	M256	*Ent. durans*	+ weak	−	−	+	+	-	+
۱۹	Y109	*Str.thermophilus*	−	−	−	-	-	+	+
۲۰	M24	*Ent. hirae*	+ weak	−	−	-	-	-	+(?)*
۲۱	B227	*Aerococcus viridians*	−	−	++	+	+	+	-
۲۲	M181	*Aerococcus viridians*	−	−	−	+	-	+	-
۲۳	M165	*Aerococcus viridians*	−	+	++	-	+	+	-
۲۴	M171	*Aerococcus viridians*	−	−	++	+	+	-	-
۲۵	M141	*Aerococcus viridians*	−	−	++	+	+	-	-
۲۶	M156	*Aerococcus viridians*	−	−	+++	+	+	+	+
۲۷	M237	*Ent. faecium*	+ weak	−	−	+	+	-	-
۲۸	M238	*Ent. faecium*	−	−	−	+	-	-	-
۲۹	M11	*Ent. faecium*	−	−	−	-	+	-	-

۳۰	M256	*Ent. faecium*	−	−	−	-	+	-	-
۳۱	M112	*Aerococcus viridians*	−	−	−	+	+	-	-
۳۲	B120	*Lb. plantarum*	−	−	−	-	+	-	-
۳۳	M101	*Aerococcus viridians*	−	−	−	+	-	-	-
۳۴	M109	*Aerococcus urineke*	−	−	−	+	+	-	-
۳۵	Y73	*Str.thermophilus*	−	−	−	+	+	-	-
۳۶	B23	*Lb. fermentum*	−	−	−	+	-	-	-
۳۷	B35	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	−	−	−	+?	+	-	+
۳۸	B37	*Lb. delbrueckii spp. lactis*	+ weak	−	−	+?	-	-	-
۳۹	Y75	*Str.thermophilus*	+ weak	−	−	-	-	-	-

(؟) مشکوک،weak :در این موارد قطر هاله تشکیل شده، ضعیف و بسیار کم بود.

تعدادعلامت‌هایمثبت،بیانگرقطرهالهبزرگترودرنتیجهمبینقدرتبازدارندگییبیشترایزولهمی‌باشد. علامتمنفی،مشخص‌کنندهعدمتولیدهالهشفافمی‌باشد.

* کد باکتری ، مخفف مراحل تولید کره مسکه است. M(Milk)مرحله شیر،B (Butter) مرحله تولید کره و Y (Yoghurt) مرحله تولید ماست.

کدهایM55 (*Leu.mesenteroides*)، M23 (*Leu.mesenteroides*) ، M268 (*Leu.mesenteroides*)، B272 (*Str.thermophilus*)، B259M245(*Str.thermophilus*) B258، (*Ent. durans*) B66، (*Str.thermophilus*) M143، (*Aerococcus viridians*) B38، (*Lb.* *delbrueckii spp. lactis*)، B39 (*Lb. delbrueckii spp. lactis*)،Y19 (*Str.thermophilus*) بر هیچ یک از باکتری‌های شاخص تاثیر ضدمیکروبی نشان دادند بنابر این در جدول فوق آورده نشده است.

در این روش ۳۹ ایزوله باکتری اسید لاکتیک بر حداقل یکی از باکتری‌های شاخص ، تاثیر بازدارندگی نشان داده است و ۱۲ ایزوله بر هیچ یک از باکتری های شاخص تاثیر بازدارندگی نداشتند. نکات قابل توجه از این جدول، اینکه اولاً در میان باکتری‌های شاخص بیماری‌زا، باکتری *E. coli* توسط بیشترین تعداد ایزوله‌ها (۱۱ ایزوله) و بعد از آن باکتری *Listeria. innocoa* توسط ۸ ایزوله و باکتری *Staph. aureus* توسط فقط ۲ ایزوله ممانعت شدند. در تحقیقی که توسط عدالتیان و همکاران (۲۰۱۱) روی باکتری‌های انتروکوکوس ایزوله شده از پنیرهای سنتی صورت گرفته بود، نتایجی مشابه با تحقیق حاضر بدست آمده بود بطوریکه در روش نفوذ در چاهک، باکتری شاخص *Staph. Aureus* توسط هیچ یک از ایزوله‌های انتروکوکوس ممانعت نشده بود. نکته قابل تامل دیگر اینکه، علیرغم تعداد بیشتر ایزوله‌هایی که اثر بازدارندگی روی باکتری *E.coli* نشان دادند، اما همانطور که از جدول ۳ بر می‌آید، این اثر بازدارندگی بصورت ضعیف می‌باشد اما در مورد باکتری لیستریا این تاثیر بازدارندگی بسیار قوی‌تر است. در تحقیقی که بر روی انتروکوکوس‌های ایزوله شده از پنیر لیقوان صورت گرفته بود، شاخص *لیستریا اینوکوآ* در بیشتر موارد به صورت خیلی قوی‌تری در مقایسه با سایر شاخص‌ها، توسط ۱۳ سویه از بین ۱۵ سویه انتروکوکوس ممانعت گردید (Edalatian, *et al*., 2012). این نتایج با یافته‌های حاصل از این پژوهش همخوانی دارد. دامنه بازدارندگی و فعالیت ضدمیکروب، در روش نفوذ در چاهک یا محیط کشت مایع، با آنچه در روش نقطه‌گذاری یا بر روی محیط کشت مایع مشاهده می‌شود، متفاوت است. این امر با گزارشات سایر محققان نیز همخوانی دارد بطوریکه فعالیت‌های ممانعت‌کنندگی مشاهده شده بر روی آگار همواره در مورد سوپرناتانت‌های فیلتر شده و خنثی شده (روش نفوذ در چاهک) مشاهده نمی‌شود. دلیل این امر وجود ترکیبات متابولیکی وابسته به کلونی[1] با فعالیت ضدمیکروبی، شامل اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و اسیدهای چرب می‌باشد که در روش نقطه‌گذاری وجود دارند و می‌توانند علت ظهور خاصیت ضدمیکروبی یا همان هاله شفاف بازدارندگی در روش نقطه‌گذاری شوند (De Vuyst & Leroy, 2007). مشخص شده است که بسیاری از انتروسین‌ها و انتروکوکوس‌های مولد انتروسین بر علیه باکتری پاتوژن‌های ناشی از غذا[2] *Listeria monocytogenes* فعالیت ضدمیکروبی دارند (Renye, *et al*., ؛ Ibarguren, *et al*., 2010 2009). همانطور که از نتایج جدول ۳، بر می‌آید از بین باکتری‌های موثر بر باکتری *Listeria monocytogenes*، برخی از آنها از جنس انتروکوکوس هستند. ممانعت از رشد گونه‌های جنس لیستریا و سایر پاتوژن‌هایی از قبیل *Staph. Aureus* بوسیله سویه‌های مولد انتروسین، استفاده و کاربرد این سویه‌ها را در حفظ ایمنی مواد غذایی مختلف، افزایش می‌دهد (Foulquié Moreno, *et al*., 2006).

در مرحله بعد، برای تاثیر پارامترهای تکنولوژیکی pH ، درجه حرارت و آنزیم پروتئاز بر روی خاصیت ضدمیکروبی و بازدارندگی سوپرناتانت فاقد سلول باکتری‌ها، بر اساس نتایج بدست آمده در جدول۳، در روش نفوذ در چاهک، فقط آن دسته از ایزوله‌هایی انتخاب شدند که بر روی باکتری شاخص *لیستریا منوسیتوژنز* موثر بودند و

1 Colony- associated metabolic compounds
2 Food- borne pathogen

هاله شفاف بازدارندگی تولید کرده بودند.

تاثیر درجه حرارت‌های مختلف بر فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت فاقد سلول (CFS)

در این مرحله، حساسیت یا مقاومت ترکیبات ضدمیکروبی یا شبه باکتریوسینی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول در برابر حرارت‌های ۳۰°C به مدت ۹۰ دقیقه، ۶۵°C به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰°C به مدت ۱۵ دقیقه و بالاخره توسط اتوکلاو (۱۲۱°C) به مدت ۱۵ دقیقه در جدول ۴، سنجیده شد. ایزوله‌های انتخاب شده برای این آزمون، ۸ ایزوله‌ای بودند که بر اساس نتایج جدول ۳، در تکنیک نفوذ در چاهک بر علیه باکتری لیستریا، تاثیر ضدمیکروبی انها اثبات شده بود. نمونه شاهد یا کنترل در این آزمون، سوپرناتانتی بود که هیچ تیمار حرارتی بر روی آن اعمال نشده بود.

جدول ٤- تاثیر تیمارهای مختلف حرارتی بر حساسیت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت فاقد سلول بر اساس قطر هاله بازدارندگی بر حسب میلی‌متر

شماره	کد باکتری	نام باکتری	باکتری شاخص *Listeria monocytogenes*				
			30°C , 90 min.	65°C, 30 min.	100°C, 15 min.	121°C, 15 min.	Control (untreated CFS)
۱	B170	*Str. thermophilus*	^{cde} ۸/۵ ± ۰/۷	^{efg}۷/۷۵ ± ۰/۳۵	^{hi}۴/۵±	^{hi}۴/۷۵± ۰/۳۵	^{*a}۹/۷۵ ± ۰/۳۵
۲	B164	*Ent. faecium*	^{cdef}۸/۲۵± ۰/۳۵	^{fg}۷/۵±	^{hi}۵±	^{hi}۴/۷۵± ۰/۳۵	^{bcd} ۸/۷۵± ۰/۳۵
۵	Y11	*Ent. durans*	^{efg} ۷/۷۵±۰/۳۵	^{efg}۷/۷۵±۰/۳۵	^{i}۴/۲۵±۰/۳۵	^{hi}۴/۵±	^{bcd}۸/۷۵±۰/۳۵
۳۰	B227	*Aerococcus viridians*	^{efg}۷/۷۵±۰/۳۵	^{g}۷/۲۵±۰/۳۵	^{i}۴/۲۵±۰/۳۵	^{i}۴/۲۵±۰/۳۵	^{cde}۸/۵±۰/۷
۳۲	M165	*Aerococcus viridians*	^{efg}۷/۷۵±۰/۳۵	^{g}۷/۲۵±۰/۳۵	^{h}۵/۲۵±۰/۳۵	^{hi}۴/۷۵±۰/۳۵	^{cde}۸/۵±۰/۷
۳۳	M171	*Aerococcus viridians*	^{cde}۸/۵±۰	^{efg}۷/۷۵±۰/۳۵	^{hi}۴/۵±	^{hi}۴/۷۵±۰/۳۵	^{ab}۹/۵±۰/۷
۳۴	M141	*Aerococcus viridians*	^{bcd}۸/۷۵±۰/۳۵	^{efg}۷/۷۵±۰/۳۵	^{hi}۴/۷۵±۰/۳۵	^{i}۴/۲۵±۰/۳۵	^{ab}۹/۵±۰/۷
۳۵	M156	*Aerococcus viridians*	^{abc}۹±۰/۷	^{defg}۸±	^{hi}۴/۷۵±۰/۳۵	^{i}۴/۲۵±۰/۳۵	^{ab}۹/۵±۰/۷

* اعداد میانگین دو تکرار به همراه انحراف معیار هستند. قطر هاله بر حسب میلی‌متر بیان شده است.حروف متفاوت در هر سطر، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد (α=۵٪) می‌باشد.

همانطور که از داده‌های جدول ۴، مشخص است با افزایش درجه حرارت از دمای ۳۰ به ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله بازدارندگی روند کاهشی را نشان می‌دهد. این امر، نشان‌دهنده این حقیقت است که این ترکیبات ضدمیکروبی، حساس به حرارت بوده و در مقایسه با نمونه شاهد، قطر هاله شفاف در تمام دماها ، کمتر بوده است. اما در بین ایزوله های موجود در جدول۴، سوپرناتانت دو ایزوله M141 و M156 که *Aerococcus viridians* شناسایی شده‌اند، دارای بیشترین حساسیت یا کمترین مقاومت در برابر شرایط حرارتی اتوکلاو (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) بودند. بر اساس معادله ۱، این امر به دلیل بیشترین کاهش در قطر هاله مشاهده شده (Δd، اختلاف قطر هاله در حالت شاهد یا کنترل با قطر هاله در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد).

$$\Delta d = d_{control} - d_{121C} \qquad (۱)$$

بر همین اساس، مقاومترین سوپرناتانت ایزوله در برابر حرارت، که دارای کمترین حساسیت و حداقل Δd، بوده است، ایزوله M165 ، *Aerococcus viridians* مشخص گردید. بطور کلی، اکثر باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی،که دارای وزن مولکولی پایین هستند، این رفتار را با افزایش دما، از خود نشان می‌دهند (Park, *et al*., 2003 ؛ Muriana & Klaenhammer,1991 ؛ Martı´n-Platero, *et al*., 2006).

تاثیر سطوح مختلف pH بر عصاره فاقد سلول باکتریایی (سوپرناتانت)

بمنظور بررسی مقاومت ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر سطوح مختلف pH، مقاومت عصاره فاقد سلول یا سوپرناتانت در pHهای مختلف ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ به کمک روش نفوذ در چاهک، ارزیابی گردید. نتایج این آزمون در جدول ۵، مشخص شده است.

جدول۵- اثر pHهای مختلف بر مقاومت یا حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی موجود در عصاره فاقد سلول ایزوله‌ها بر حسب قطر هاله بازدارندگی (بر حسب میلی‌متر)

شماره	کد باکتری	نام باکتری	باکتری شاخص (*Listeria monocytogenes*)									
			pH=3		pH=5		pH=7		pH=9		pH=11	
			control	CFS	control	CFS	control	CFS	control	CFS	control	CFS
۱	B170	*Str. thermophilus*	۸±۰	^{a}۱۳±۱/۴۱	۵±۰	^{de}۱۰±۰	✻۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۲	B164	*Ent. faecium*	۷±۱/۴۱	^{ab}۱۲/۵±۲/۱۲	۴/۵±۰/۷۰	^{de}۱۰±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۵	Y11	*Ent. durans*	۸±۰	^{ab}۱۲/۵±۰/۷	۵±۰	^{de}۱۰±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۰	B227	*Aerococcus viridians*	۸/۵±۰/۷	^{cde}۱۰/۵±۰/۷	۶±۱/۴۱	^{fg}۸±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۲	M165	*Aerococcus viridians*	۹±۱/۴۱	^{abc}۱۲±۲/۸۲	۸±۲/۸۲	^{de}۱۰±۲/۸۲	۰	^{gh}۶/۵±۰/۷	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۳	M171	*Aerococcus viridians*	۸±۱/۴۱	^{bcd}۱۱±۱/۴۱	۵/۵±۰/۷	^{fgh}۷/۵±۰/۷	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۴	M141	*Aerococcus viridians*	۸±۱/۴۱	^{abc}۱۲±۰	۶±۱/۴۱	^{ef}۹±۱/۴۱	۰	^{h}۶±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰
۳۵	M156	*Aerococcus viridians*	۸±۰	^{ef}۹±۰	۰	^{gh}۷±۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰	۰	^{i}۰

✻ قطر چاهک در این آزمون ۴ میلی‌متر بوده است و قطر چاهک در این حالت از قطر هاله کم شده است.حروف متفاوت در هر سطر، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۵ درصد (α=۵٪) می‌باشد.

ارزیابی‌های فعالیت آنتاگونیستی (ضدمیکروبی) سوپرناتانت فاقد سلولی باکتریایی در pHهای مختلف نشان داد که در pHهای بین ۳ تا ۵، فعالیت بازدارندگی یا قطر هاله بازدارندگی، نسبت به حالت تیمار نشده افزایش دارد که این امر به دلیل اسیدیته ناشی از اسید لاکتیک تولید شده می‌باشد. حداکثرفعالیت ضدمیکروبی یا آنتاگونیستی در pH=۳ مشاهده شد و با افزایش pH به سمت خنثی و قلیایی، روند کاهشی نشان داد. Cardoso و همکاران (۲۰۱۲) روند مشابهی را برای فعالیت ضدمیکروبی سوپرناتانت باکتری *Ent. faecalis* DBFIQ E24 با افزایش pH مشاهده کردند. فعالیت ضدمیکروبی در تحقیق این دانشمندان بصورت اندکی تحت تاثیر pH محیط کشت قرار گرفت و بطور معکوس متناسب با pH می‌باشد. بر خلاف این نتایج، Martı´n-Platero و همکاران (۲۰۰۶)، و Sparo و همکاران (۲۰۰۶)، تغییری در فعالیت ضدمیکروبی در دامنه pH ۴ تا ۸ ، مشاهده نکردند. نکته قابل توجه و جالب در جدول ۴، مربوط به دو ایزوله M165 و M141 است که هردو متعلق به گونه *Aerococcus viridians*می‌باشند و در pH خنثی برابر با ۷، قطر هاله بازدارندگی برابر با ۶/۵ و ۶ داده‌اند، با توجه به اینکه در این pH، اثر اسید خنثی شده است، می‌توان ایجاد هاله شفاف را به ترکیبات ضدمیکروبی یا شبه باکتریوسینی غیر از اسید لاکتیک تولید شده توسط این ایزوله‌ها نسبت داد. همچنین شکل ۲، هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *Aerococcus viridians* بر روی باکتری شاخص *Listeriainnocoa* را در pHهای مختلف (۳ تا ۱۱) نشان می‌دهد.

شکل ۲-هاله شفاف حاصل از بازدارندگی سویه *Aerococcus viridians* روی باکتری شاخص *Listeria innocoa* در pHهای مختلف (۳ تا ۱۱).

تاثیر آنزیم پروتئیناز K بر عصاره فاقد سلول باکتریایی

نتایج حاصل از آزمون آنزیم پروتیئناز K، روی سوپرناتانت فاقد سلول ۸ ایزوله مورد آزمون، در جدول ۵، آورده شده است.

جدول ۵- اثر آنزیم پروتئیناز K ، بر مقاومت یا حساسیت ترکیبات شبه باکتریوسینی موجود در عصاره فاقد سلول ایزوله‌ها بر حسب قطر هاله بازدارندگی (بر حسب میلی‌متر)

شماره	کد باکتری	نام باکتری	باکتری شاخص (*Listeria monocytogenes*)		
			Proteinase K+ CFS	Control(BHI + Proteinase K)	untreated CFS
۱	B170	*Str. thermophilus*	^{f}۰	^{f}۰	^{a*}۹/۷۵ ± ۰/۳۵
۲	B164	*Ent. faecium*	^{d}۳/۵±۰/۷	^{f}۰	^{bc}۸/۷۵± ۰/۳۵
۵	Y11	*Ent. durans*	^{f}۰	^{f}۰	^{bc} ۸/۷۵±۰/۳۵
۳۰	B227	*Aerococcus viridians*	^{e}۲/۵±۰/۷	^{f}۰	^{c}۸/۵±۰/۷
۳۲	M165	*Aerococcus viridians*	^{f}۰	^{f}۰	^{c}۸/۵±۰/۷
۳۳	M171	*Aerococcus viridians*	^{f}۰	^{f}۰	^{ab}۹/۵±۰/۷
۳۴	M141	*Aerococcus viridians*	^{f}۰	^{f}۰	^{ab}۹/۵±۰/۷
۳۵	M156	*Aerococcus viridians*	^{f}۰	^{f}۰	^{ab}۹/۵±۰/۷

قطر چاهک در این آزمون ۴ میلی‌متر بوده است. قطر هاله از قطر چاهک کم شده است.

همانطور که ملاحظه می‌شود، آنزیم پروتئولیتیک پروتئیناز K، روی خاصیت ضدمیکروبی سوپرناتانت همه ایزوله‌ها، به جز دو مورد، تاثیر داشته است بطوری‌که هاله بازدارندگی آنها، صفر شده است. این پدیده، مبین این حقیقت است که ماهیت ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت این ایزوله‌ها، می‌تواند پروتئینی باشد، چراکه مورد تجزیه و غیرفعال شدن یک آنزیم پروتئولیتیک قرار گرفته است. اما، در مورد دو ایزوله B164 (*Ent. faecium*) و B227 (*Aerococcus viridians*)، حتی پس از تاثیر و تیمار با آنزیم پروتئیناز K، هاله شفاف بازدارندگی مشهود بوده است. با این آزمون، می توان نتیجه گرفت که ماهیت ضدمیکروبی ترکیبات موجود در سوپرناتانت سایر ایزوله ها به استثناء این دو ایزوله فوق‌الذکر، می‌تواند پروتئینی باشد.

نتیجه‌گیری

از بین ۵۱ ایزوله باکتری اسید لاکتیک که از مراحل مختلف تولید کره سنتی مسکه جداسازی شده بود، ۴۴ ایزوله ، در روش نقطه‌گذاری، حداقل روی یکی از باکتری‌های شاخص (اعم از باکتری‌های شاخص بیماری‌زا و یا غیر بیماری‌زا) موثر بوده است. در حالیکه در روش نفوذ در چاهک، ۳۹ ایزوله، حداقل بر یکی از باکتری‌های شاخص مورد آزمون، اثر ممانعت‌کنندگی داشته است. در روش نقطه‌گذاری، دو ایزوله B161(*Ent. faecium*) و B258 (*Str.thermophillus*) بیشترین قطر هاله بازدارندگی و در نتیجه بیشترین فعالیت ممانعت‌کنندگی را روی باکتری شاخص *Listeria innocoa* از خود نشان دادند. اما در روش نفوذ در چاهک، باکتری شاخص *E.coli*، توسط بیشترین تعداد ایزوله‌ها ممانعت شده بود، اما باکتری شاخص *Listeria innocoa*، با توجه به تعداد کمتر ایزوله‌هایی که مورد ممانعت قرار گرفته بود، اما قدرت بازدارندگی این ایزوله‌ها بر روی شاخص *Listeria innocoa*، از نظر قطر هاله بازدارندگی بیشتر بود. در نهایت تعداد ۸ ایزوله از مرحله نفوذ در چاهک که دارای اثر ممانعت‌کنندگی بر روی شاخص *Listeria innocoa* بودند برای مراحل بعدی انتخاب شدند. سپس تاثیر پارامترهای مختلف تکنولوژیکییا فیزیکوشیمیایی از جمله درجه حرارت‌های مختلف، pHهای متفاوت و آنزیم پروتئیناز K، روی فعالیت ممانعت‌کنندگی سوپرناتانت فاقد سلول ۸ ایزوله (بر روی باکتری شاخص *Listeria innocoa*) بررسی و مشخص گردید. در آزمون اثر حرارت، مقاوم‌ترین سوپرناتانت فاقد سلول در برابر حرارت، متعلق به ایزوله M165، *Aerococcus viridians* بود. در آزمون اثر pH، فقط دو ایزوله M165 و M141 که هردو متعلق به گونه *Aerococcus viridians* می‌باشند، در pH خنثی برابر با ۷، قطر هاله بازدارندگی برابر با ۶/۵ و ۶ داده‌اند، که از این حیث حائز اهمیت هستندکه می‌توان ایجاد هاله شفاف را به ترکیبات ضد میکروبی یا شبه باکتریوسینی غیر از اسیدلاکتیک تولید شده توسط این ایزوله‌ها نسبت داد. در آزمون تاثیر پروتئیناز K ، تنها دو ایزوله B164 (*Ent.faecium*) و ایزوله B227 (*Aerococcus viridians*) پس از تیمار با آنزیم مورد نظر، فعالیت بازدارندگی خود را همچنان حفظ کردند و سایر ایزوله‌ها، هیچ فعالیت بازدارندگی از خود نشان ندادند. این مسئله می‌تواند احتمال این واقعیت را قوت بخشد که ترکیبات ضدمیکروبیا شبه باکتریوسینی در این دو ایزوله، ماهیت غیرپروتئینی داشته باشند. چون علیرغم تجزیه ترکیبات پروتئینی توسط آنزیم پروتئولیتیک پروتئیناز K،در سوپرناتانت این دو ایزوله، ولی باز هم ما شاهد هاله شفاف حاصل از بازدارندگی بودیم. در پایان می‌توان این چنین نتیجه گرفت که چنانچه بخواهیم از این ایزوله‌ها یا سوپرناتانت فاقد سلول آنها بعنوان نگهدارنده‌های بیولوژیکی[1]، استفاده نماییم، می‌توان از ایزوله M165 (*Aerococcus viridians*) در مواد غذایی که فرایند حرارتی بالا برای آنها استفاده می‌شود، استفاده نمود، زیرا

1Biopreservative

ترکیبات ضدمیکروبی موجود در سوپرناتانت این ایزوله، مقاومت حرارتی بیشتری از خود نشان داد. در مواد غذایی اسیدی و با pH پایین، می‌توان از ایزوله‌هایی استفاده کرد که سوپرناتانت آنها در pHهای پایین، فعالیت ضدمیکروبی خود را حفظ کرده‌اند و در مواد غذایی با pH خنثی از ایزوله‌های M165 و M141 که این pH فعالیت ضدمیکروبی خود را حفظ کرده‌اند، بهره جست. در پایان پیشنهاد می‌شود که قبل از استفاده از این ایزوله‌ها یا سوپرناتانت فاقد سلول آن‌ها، مطالعات در داخل مواد غذایی یا *in Situ* نیز جهت اطمینان از قابلیت کاربرد آنها در مواد غذایی، انجام داد.

قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات جناب آقای مهندس قزوینی که در انجام آزمایش‌ها ما را یاری نمودند، صمیمانه قدردانی می‌کنند. مقاله علمی– پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۲، با کد ۲۳۱۱۰ در گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. لذا نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد جهت یاری رساندن در انجام طرح کد ۲۳۱۱۰ صمیمانه سپاسگزاری نمایند.

منابع

Alegría, A., Alvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136: 44-51.

Cardoso, M. D. L. M., Manzo, R. M., Tonarelli, G. G., and Sionetta, A. C. 2012. Characterisation of a cell-free supernatant obtained from cultures of Enterococcus faecalis DBFIQ E24 with antagonistic activity against bacteria, yeasts and moulds. *International Journal of Dairy Technology*, 65(4), pp:568-577.

Chen, H. 2003. Bacteriocins and their food applications. CRFSFS, 82-100.

Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3: 777-788.

De Vuyst, L., Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:194–199.

Edalatian, M. R., Habibi Najafi, M. B., Mortazavi, S. A., Alegría, A., Delgado, S., Bassami, M. R., Mayo, B. 2012.Production of bacteriocins by Enterococcus spp. isolated from traditional, Iranian, raw milk cheeses, and detection of their encoding genes. *Eur Food Res Technol* , 234:789–796.

Edalatian, M. R., Habibi Najafi, M. B., Mortazavi, S. A., Alegría, A., Nassiri, M. R., Bassami, M. R., Mayo, B. 2012. Microbial diversity of the traditional Iranian cheeses Lighvan and Koozeh, as revealed by polyphasic culturing and culture-independent approaches. *Dairy Sci Technol*. 92:75‑90.

Fleming, H. P., Etchells, J. L., Costilow, R. L. 1985. Microbial inhibitionby an isolate of Pediococcus from cucumber brines. *Appl Microbiol*30:1040–1042

Foulquié Moreno, M., Rea, M. C., Cogan, T. M., De Vuyst, L. 2006. Applicability of a bacteriocin-producing Enterococcus faecium as a co-culture in Cheddar cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 81:73–84.

Guinane, C. M. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *J Appl Microbiol*, 1316-1325.

Ibarguren, C., Raya, R. R., Apella, M.C., Audisio, M.C. 2010.Enterococcus faecium isolated from honey synthesized bacteriocin-like substances active against diVerent Listeria monocytogenes strains. *J Microbiol* 48:44–52.

Idoul, T., and Karam, N. 2008. Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas Y Aceites*, 59 (4): 361-367.

Khay, E.O., Idaomar, M., Castro, L. M. P., Bernardez, P. F., Shanhaji, N. S., Abrini, J. 2011. Antimicrobial activities of the bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria isolated from Moroccan dromedary milk. *African Journal of Biotechnology*, 10(51), pp: 10447-10455.

Lou, F., Feng, S.,Qun, S., Xiang, W., Zhao, J., Zhang, J., and Yang, Z. 2011. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. *Food Control*, 22, pp: 50-53.

Martı´n-Platero A M, Valdivia E, Ruı´z-Rodrı´guez M, Soler J J, Martı´n- Vivaldi M, Maqueda M and Martı´nez-Bueno M. 2006. Characterization of antimicrobial substances produced by Enterococcus faecalis MRR 10- 3, isolated from the uropygial gland of the hoopoe (Upupa epops). *Applied and Environmental Microbiology* 72 4245–4249.

Muriana P M and Klaenhammer T R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus 11088. *Applied and Environmental Microbiology* 57 114–121.

Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of Listeria spp. infood. *J. Food Protect*. 59 (Suppl.), 54–63.

Nandakumar, R. 1999. Quantification of nisin in flow-injection immunoassay system. *Biosens Bioelec*, 241-247.

Olasapo, N. A. 1999. Occurrence of nisin z production in Lactococcus lactis BFE 1500 isolated from wara, a traditional

Nigerian cheese product. *Int J Food Microbiol*,141-152.

Parente, E., Hill, C. 1992. Characterization of enterocin 1146, abacteriocin from Enterococcus faecium inhibitory to Listeriamonocytogenes. *J. Food Protect. 55*, 497–502 .

Park S H, Itoh K and Fujisawa T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by Enterococcus faecium JCM 5804T. *Journal of Applied Microbiology* 95 294–300.

Renye JA, Somkuti GA, Paul M, van Hekken DL. 2009. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by Enterococcus faeciumand Enterococcus duransisolates from Hispanic-style cheeses. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:261–268.

Riley, M. A., Chavan. M. A. 2007. Bacteriocins, Ecology and Evolution, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:53-81.

Rodriguez, E., Gonzalez, B. 2006. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*,10: 7-15.

Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394-406.

Schleifer K H .1986. Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Schleifer KH and Kilpper-Briltz R. 1987. Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol* 10: 1-19. doi: 10.1128/JCM.42.2.497-504.2004

Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper-Bälz R, Collins MD and Fischer W.1985. Transfer of Streptococcus lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 6: 183–195. doi: 0.1016/S0723-2020(85)80052-7

Sparo M D, Castro M S, Andino P J, Lavigne M V, Ceriani C, Gutie´rrez G L, Ferna´ndez M M, De Marzi M C, Malchiodi E L and Manghi M A .2006. Partial characterization of enterocin MR99 from a corn silage isolate of Enterococcus faecalis. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 123–134.

Van Hoorde, K., and Verstraete,T. 2008. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*, 25: 929– 935.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 12, No. 4, Oct- Nov 2016, p. 438-452

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۲، شماره ۴، مهر - آبان ۱۳۹۵، ص. ۴۵۲-۴۳۸

Evaluation of antimicrobial activities of lactic flora isolated from production stages of Maskeh against food indicator bacteria

M. R. Edalatian Dovom[1*], M. Yavarmanesh[2], F. GhiamatiYazdi[3], M. Khomeiri[4], N. Nayyeri [5]

Received: 2014.06.11
Accepted: 2014.11.05

Introduction: Lactic acid bacteria (LAB) are a group of gram positive, catalase negative bacteria which possess unique metabolic, physiological and morphological characteristics. In addition, lactic acid bacteria are considered as a valuable source of antimicrobial agents including bacteriocins. Bacteriocins are defined as non-toxic peptides produced by LAB. "Maskeh" as an Iranian traditional butter carries indigenous LAB which secrete and harbor bacteriocins. Our objective in this study was to evaluate the influence of antimicrobial compoundsproduced by isolated LAB from Maskeh, a local traditional butter, against some pathogenic bacteria suchas: *staphylococcus aureus*, *Listeria innocoa* and *E. coli* using culture-based methods. In the following step, influence of some technological parameters including different temperatures, pHs and proteinase K were determined on stability of antimicrobial compounds in bacteriocins.

Materials and methods: Three samples of milk, yoghurt and local butter known as Maskeh were collected from different regions in the south ofKhorasanRazavi, Gonabadcity.

Indicator microorganisms and culture condition: In order to activate the indicators, following the cultivation in corresponding and suitable media, they were incubated for 24 hours in suitable temperatures.

Survey of antimicrobial activities: In Agar Spot, Antagonistic activities of isolates were evaluated in solid media. Finally clear zone of inhibition was measured in mm. In Well- Diffusion Assay (WDA), positive isolates from previous step, were selected for this assay. In this method, cell-free supernatant (CFS) of isolates were examined for their antagonistic activities. Finally clear zone of inhibition were evaluated around the wells.

Determination of antimicrobial compound nature: Effect of proteinase K on CFS: In order to evaluate the enzyme sensitivity of bacteriocin like compounds produced by LAB, CFS of isolates were subjected to proteinase K (final concentration 0.5 mg/ml). Mixture of enzyme- CFS was incubated in 37C for four hours. Finally, the remaining inhibitory activity was determined using WDA.

Influence of different temperatures on CFS: Heat sensitivity of bacteriocin like compounds was evaluated with subjecting the CFS of isolates to various temperatures. Again remaining activity of isolates was evaluated with the help of WDA.

Influence of different levels of pH on CFS: CFS of isolates was adjusted at different pHs and their inhibitory effects were determined using WDA.

Discussion & Results: Following the sequencing, 51 isolates were identified from different steps of Maskeh production. Results showed that 44 out of 51 isolates were effective at least against one indicator. It was clear that *E.coli*, *Staph.aureus, Listeria. innocoa*, *Lb.plantarum, Lb.sake, Lac.lactis* ssp. lactis,*Lac.lactis* ssp. *cremoris* were inhibited by 33, 7,11,12,7,35 and 7 isolates, respectively. Among pathogenic indicator bacteria, *E.coli* was inhibited maximally and regarding the non-pathogenic indicators, Lac.lactis ssp. Lactis was inhibited by the most of the isolates. Among the isolates, *Ent.faecium* B161 and *Str.thermophilus* B258 presented the highest inhibitory effect against *Listeria.innocoa*.Interestingly both these strains had been isolated from Maskeh, implying that they originated the same source. Formation of clear inhibition zone in agar spot method is related to colony-associated antimicrobial compounds like H_2O_2, lactic acid and other organic acids. Also, the strongest clear zone of inhibition was against *Listeria.innocoa*. *Lb.plantarum* B120 showed inhibitory effect against 6 out of 7 indicator bacteria. This strain has been isolated from Maskeh, and only did not affect on *Lac.lactis* ssp. *lactis*.In the next step, in WDA, CFS obtained from isolates were subjected to inhibition activity evaluation. In

1, 2 and 5. Assistant Professors and Former MSc Student,, Department of Food Science and Technology, Agriculture Faculty, Ferdowsi University of Mashhad.
3- Ph.D Student of Food Microbiology, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan Iran.
4- Associate Professor,Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences andNatural Resources.
(*-Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)

this assay, 39 isolates showed inhibitory activity against at least one indicator and 12 isolates had no inhibition against indicators. *E.coli* was inhibited by the most of the isolates (11), followed by *Listeria.innocoa* by 8 and *Staph.aureus* by 2 isolates. But noticeable point is that the strongest influence was seen against Listeria. In the last step, influence of technological parameters such as : temperature, pH and enzyme were determined on antimicrobial and inhibitory activity of CFS. In this survey, only those isolates were chosen which showed inhibitory effect against *Listeria innocoa*. Regarding the temperature, with increasing of this factor, the diameter of clear zone had decreasing trend. This means that bacteriocin- like compounds are sensitive to heat. Among analyzed isolates, CFS of two isolates namely *Aerococcusviridans* M156 and M141 possess the highest sensitivity. In contrast, the highest resistance was related to *Aerococcusviridans* M165. Evaluation of antagonistic activity of CFS of isolates at different pHsexperienced, in pH between 3-5, growing trend of inhibitory activity which is due to produced lactic acid. Maximum of antagonistic activity was seen at pH=3 and along with pH increase toward the alkaline condition, it decreased.*Aerococcusviridans* M165 and M141 showed clear zone of inhibition equal to 6.5 and 6, respectively at pH=7.Proteniase K as a proteolytic enzyme, exhibited decomposing influence on antimicrobial effects of all isolates, except two of them. This phenomenon implies the proteinaceous nature of antimicrobial compound in CFS, because of decomposition as a result of proteolytic enzyme. But regarding two isolates, the clear zone did mot destroyed even after enzyme treatment.

Conclusion: Some CFS or their producing isolates can be exploited as bio-preservatives; CFS of *Aerococcusviridans* M 165 can be applied in foods subjected to high heat treatment. In acidic and low pH food, we can use those isolates which theirCFS remain their activity at low pH.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Antagonistic Activity, Bacteriocin, Agar Spot, Well Diffusion Assay.