Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

# Investigating of the antimicrobial effects of isolated *Weissella cibaria* and its cell free culture filtrate obtained from different growth phases

**Maryam Khashaie[1], Maryam Ebrahimi[2], Alireza Sadeghi[1]**

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Cereal Health Research Center, Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2016/08/11
Accepted: 2017/05/10
Available online: 2017/06/07

**Article Subject:**
Food Microbiology

**IJMM 2017; 11(2): 42-52**

**Corresponding author:**

**Dr. Alireza Sadeghi1**

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

**Tel: 0981732251701**

**Email:**
**sadeghi.gau@gmail.com**

## *Abstract*

**Background and Aims:** Lactic acid bacteria play an important role in production and storage of fermented foods. This study aimed to evaluate the antimicrobial properties of a dominant lactic acid bacteria isolated from barley sourdough against some of foodborne indicator bacteria.

**Materials and Methods:** In this experimental study which was conducted in 2015-2016 at Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, after molecular identification of dominant lactic acid bacteria isolated from whole barley sourdough, antimicrobial effect of the isolate and it's cell free culture filtrate as native and neutralized cell free culture filtrate obtained from logarithmic and stationary phases were investigated based on disc diffusion and microdilution (antibacterial effect) and overlay and agar spore spot (antifungal effect) methods. Results were also compared by the one way analysis of variance.

**Results:** Sequencing results of PCR products lead to identification of *Weissella cibaria* as a dominant lactic acid bacteria isolated from whole barley sourdough. Based on the results of investigating of the antibacterial effect the highest antagonistic effect of the isolate and it's native cell free culture filtrate obtained from logarithmic phase were observed against *Bacillus subtilis* that was significantly ($P<0.05$) more than the other indicator bacteria. Furthermore, *W. cibaria* and it's cell free culture filtrate had proper antifungal effects on *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*.

**Conclusions:** Based on the results of this study, it is possible to use *W. cibaria* and it's cell free culture filtrate as biopreservative for controlling some microbial indicators in food and medical industries.

**KeyWords:** *Weissella cibaria*, Antimicrobial effect, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Khashaie M, Ebrahimi M, Sadeghi A. Investigating of the antimicrobial effects of isolated *Weissella cibaria* and its cell free culture filtrate obtained from different growth phases. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2): 42-52

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

# بررسی اثرات ضد میکروبی جدایه *ویسلا سیباریا* و پالیده‌های حاصل از فازهای مختلف رشد آن

مریم خشایی[۱]، مریم ابراهیمی[۲]، علیرضا صادقی[۱]

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

۲. مرکز تحقیقات سلامت غلات، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

*اطلاعات مقاله*

**تاریخچه مقاله**

**دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۲۱**

**پذیرش: ۱۳۹۶/۰۲/۲۰**

**انتشار آنچاهک: ۱۳۹۵/۰۳/۱۷**

**موضوع:**

میکروبیولوژی مواد غذایی

**IJMM 1396; 11(2): 42-52**

**نویسنده مسئول:**

**دکتر علیرضا صادقی**

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

**تلفن: ۰۹۸۱۷۳۲۲۵۱۷۰۱**

**پست الکترونیک:**

**sadeghi.gau@gmail.com**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش مهمی در تولید و نگهداری مواد غذایی تخمیری ایفا می‌کنند. این مطالعه باهدف ارزیابی خواص ضد میکروبی یکی از باکتری‌های اسیدلاکتیک غالب جداشده از خمیرترش آرد جو برعلیه برخی از شاخص‌های میکروبی غذازاد انجام گردید.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه تجربی که در سال‌های ۱۳۹٤ و ۱۳۹۵ در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد، پس از شناسایی مولکولی جدایه لاکتیکی غالب خمیرترش آرد جو، اثر ضد میکروبی جدایه مذکور و همچنین پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن بر اساس روش‌های انتشار در دیسک و میکرودایلوشن (ضد باکتریایی) و همچنین کشت دولایه و لکه‌گذاری سوسپانسیون اسپور (ضد قارچی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه، تجزیه و تحلیل گردید.

**یافته‌ها:** توالی‌یابی محصولات PCR، منجر به شناسایی *ویسلا سیباریا* به‌عنوان یکی از جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو شد. نتایج ارزیابی اثر ضد باکتریایی نیز حاکی از بروز معنی‌دار (P<۰/۰۵) بیشترین تأثیر بازدارنده این جدایه و همچنین پالیده خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی آن بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* در مقایسه با سایر شاخص‌های باکتریایی بود. علاوه بر این، مشخص شد که *ویسلا سیباریا* و پالیده‌های کشت آن از قابلیت ضد قارچی مناسبی برعلیه *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* برخوردار هستند.

**نتیجه‌گیری:** بر اساس نتایج این پژوهش، می‌توان از جدایه *لاکتیکی ویسلا سیباریا* و پالیده‌های کشت آن به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی در کنترل رشد برخی از شاخص‌های میکروبی در صنایع غذایی و دارویی استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** *ویسلا سیباریا*، اثر ضد میکروبی، *باسیلوس سوبتیلیس*، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس نایجر*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

استفاده از خمیرترش در فرآوری نان، یکی از قدیمی‌ترین کاربردهای بیوتکنولوژیکی در صنعت مواد غذایی محسوب می‌شود. خمیرترش شامل مخلوطی از آرد غلات و آب بامزه تند اسیدی است که حاوی مخمرها و باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌باشد (۱). میکروارگانیسم‌های موجود در خمیرترش نقش مهمی در بهبود خواص کاربردی، تغذیه‌ای، سلامتی‌بخش، حسی و ماندگاری نان ایفا می‌کنند (۲). باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در انواع خمیرترش مطرح بوده و با تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، استون، پر اکسید هیدروژن، روتروسایکلین، پپتیدهای ضد قارچی و باکتریوسین‌ها قادر هستند میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد را کنترل نمایند (۳). در سال‌های اخیر، تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از غذاهای عاری از نگه‌دارنده‌های شیمیایی افزایش‌یافته است. این موضوع اهمیت

استفاده از کشت‌های میکروبی محافظت‌کننده را نشان می‌دهد. باکتری‌های اسیدلاکتیک با تولید ترکیبات ضد میکروبی می‌توانند یک جایگزین مناسب برای نگه‌دارنده‌های شیمیایی باشند که علاوه بر تولید مواد ضد میکروبی، می‌توانند نقش مثبتی در بهبود عطروطعم، بافت، ارزش تغذیه‌ای و سلامتی بخش فراورده‌های تخمیری داشته باشند (۴). مطالعاتی بر روی کنترل رشد میکروارگانیسم‌ها و افزایش زمان ماندگاری توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک انجام‌شده است که نشان‌دهنده کاهش خطرات تهدیدکننده سلامت انسان توسط آن‌ها است (۵). به‌عنوان‌مثال، Simsek و همکاران (۲۰۰۶) باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای خاصیت ضد میکروبی را از خمیرترش جدا کردند که ازاین‌بین، بهترین گونه‌های دارای قابلیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس‌های برویس*، *دلبروکی*، *وریدنسیس* و همچنین *پدیوکوکوس* بودند (۶). Mentes و همکاران (۲۰۰۷) نیز فعالیت ممانعت‌کنندگی *لاکتوباسیلوس‌های پلانتاروم* و *آلیمنتاریوس* جداشده از خمیرترش را در مهار رشد سویه‌های *باسیلوس* عامل فساد نان مطالعه کردند (۷). همچنین Corsetti و همکاران (۲۰۰۸) قابلیت تولید باکتریوسین در باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از خمیرترش را موردبررسی قرار داده‌اند (۸). Cizeikiene و همکاران (۲۰۱۳) نیز تأثیر ضد میکروبی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس سیکی*، *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیس* و *پدیوکوکوس پنتازاسئوس* را در مقابل *باسیلوس*، *سودوموناس*، *لیستریا*، *اشریشیا* و قارچ‌های *فوزاریوم*، *پنیسیلیوم*، *آسپرژیلوس*، *دباریومایسز* و *کاندیدا* موردمطالعه قرار داده و دریافتند که باکتری‌های اسیدلاکتیک با تولید ترکیباتی مانند اسیدهای آلی می‌توانند به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی به‌طور گسترده‌ای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد را مهار نمایند (۹). هدف از اجرای این پژوهش، جداسازی و شناسایی مولکولی یکی از جدایه‌های لاکتیکی غالب موجود در خمیرترش آرد کامل جو و بررسی ویژگی‌های ضد میکروبی جدایه مذکور و پالیده‌های کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن در برابر برخی از شاخص‌های باکتریایی و قارچی مواد غذایی بود.

## مواد و روش‌ها

### مواد اولیه

این مطالعه تجربی طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ انجام شد. آرد جو پوشینه‌دار مورد استفاده (رقم گرگان ۴) در این پژوهش دارای ۱۱/۶ درصد پروتئین، ۶۱/۷ درصد کربوهیدرات و ۱/۹ درصد خاکستر بود. این ویژگی‌ها بر اساس روش‌های مصوب AACC (۲۰۱۰) تعیین گردید (۱۰). کشت‌های لیوفیلیزه باکتری‌ها و قارچ‌های شاخص مورداستفاده شامل *اشریشیاکلی* (*Escherichia coli* PTCC 1399)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* PTCC 1112)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* PTCC 1298)، *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis* PTCC 1720)، گونه‌های *لاکتوباسیلوس* (*Lactobacillus* spp. PTCC 1332)، *آسپرژیلوس نایجر* (*Aspergillus niger* PTCC 5012) و *آسپرژیلوس فلاووس* (*Aspergillus flavus* PTCC 5006) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شد. مواد شیمیایی و محیط‌های کشت مصرفی نیز از شرکت مرک آلمان خریداری گردید.

### تهیه خمیرترش

پس از تهیه پیش تیمارهایی با نسبت‌های مختلف آرد به آب (۲۰ تا ۵۰ درصد)، نهایتاً نسبت ۳۰ درصد آرد به آب بر اساس روند تغییرات اسیدیته قابل تیتر به‌منظور غالب شدن فلور لاکتیکی برای تهیه خمیرترش آرد کامل جو انتخاب شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس (انکوباتور آزمایشگاهی، Behdad، Iran) به مدت ۲۴ ساعت تخمیر گردید. سپس در هرروز ۲۰ درصد از خمیرترش روز قبل به مخلوط آب و آرد تازه، اضافه‌شده و مجدداً در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. این عمل (back-slopping) تا رسیدن به pH حدود ۴ تکرار گردید (۱۱).

### تعیین pH و اسیدیته

برای تعیین اسیدیته قابل تیتر نمونه‌های خمیرترش (برحسب اسیدلاکتیک)، ۱۰ گرم از آن با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر، مخلوط و یکنواخت شده و سپس توسط محلول سود ۰/۱ نرمال (Germany ،Merck) تا رسیدن به pH معادل ۸/۵ تیتر گردید. اسیدیته نیز برحسب حجم سود مصرفی برحسب میلی‌لیتر بیان شد. میزان pH نمونه‌های خمیرترش نیز با pH متر (Germany ،Knick،766 Calimatic) تعیین گردید (۱۲).

### شمارش و جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک

شمارش باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش به‌وسیله رقت سازی متوالی و کشت سطحی رقت‌های تهیه‌شده بر روی محیط کشت MRS agar (Germany ،Merck) بعد از



Final Proof

گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت انجام شد. سپس پرگنه‌های عمده، انتخاب و از آن‌ها کشت خطی تهیه گردید. در پایان بر روی پرگنه خالص به‌دست‌آمده، آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم و کاتالاز صورت گرفت و با میکروسکوپ آزمایشگاهی (Germany ،Zeiss) بررسی شد (۱۳).

**استخراج DNA**

برای استخراج DNA از تک پرگنه خالص کشت خطی جدایه موردنظر، از کیت استخراج (K-3032، Bioneer، South Korea) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد.

**واکنش PCR**

برای شناسایی مولکولی جدایه لاکتیکی از PCR دارای پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت 5′GAACGCGAAGAACCTTAC3′ و 5′GCGTGTGTACAAGACCC3′ استفاده شد (۱۴). توالی هدف تکثیر این جفت پرایمر نیز بخشی از ناحیه متغیر V6-V8 جایگاه حفاظت‌شده ۱۶S rDNA باکتری‌های اسیدلاکتیک به طول ۵۰۰ جفت باز بود. برای تکثیر توالی هدف، مخلوط واکنشگرها (Robust، France) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل DNA الگو (۱۰۰ ng)، بافر PCR (۱۰ x)، مخلوط جفت پرایمر رفت و برگشت (۰/۵ mM)، dNTPs (۱۰ mM)، $MgCl_2$ (۲۵ mM)، آنزیم Taq DNA polymerase (فعالیت ۲/۵ واحد) و آب مقطر استریل دیونیزه با برنامه دمایی ۵ دقیقه واسرشت ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه محصول در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و نهایتاً گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (CG1-96، Corbett، Australia) قرار داده شد. سپس برای تأیید اولیه تکثیر، محصول PCR به ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد رنگ SYBR safe (Invitrogen، America) منتقل و در بافر TBE الکتروفورز گردید. محصول PCR برای تأیید نهایی و تعیین توالی به شرکت MWG آلمان نیز ارسال گردید (۱۴).

**تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی**

بدین منظور پس از کشت جدایه لاکتیکی در محیط کشت MRS broth در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، با اندازه‌گیری جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (T80 Double Beam UV-Visible، PGI، England) در فواصل زمانی یک‌ساعته طی ۲۴ ساعت، منحنی رشد ترسیم گردید (۱۵).

**تعیین خواص ضد باکتریایی**

به‌منظور ارزیابی خواص ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی از دو روش انتشار در دیسک و میکرودایلوشن استفاده شد.

**روش انتشار در دیسک**

برای ارزیابی خاصیت ضد باکتریایی جدایه لاکتیکی فعال در برابر باکتری‌های شاخص *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا منوسیتوژنز* و *باسیلوس سوبتیلیس* به روش انتشار در دیسک، ابتدا جدایه لاکتیکی و باکتری‌های شاخص، فعال‌سازی شدند. سپس جمعیت شاخص‌های باکتریایی و جدایه لاکتیکی به $1\times10^{8}$ cfu/mL رسانده شد (معادل نیم مک‌فارلند). در ادامه باکتری‌های شاخص بر روی محیط کشت Nutrient agar (Merck، Germany) به شکل سطحی کشت داده شدند. سپس دیسک‌های کاغذی استریل (Padtanteb، Iran) بافاصله معین از لبه پلیت در سطح محیط کشت حاوی باکتری‌های شاخص قرار داده شد و ۴۰ میکرولیتر از جدایه لاکتیکی بر روی دیسک‌های کاغذی منتقل گردید. نهایتاً پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری گردیدند. قطر هاله عدم رشد نیز با نرم‌افزار ImageJ (Java, USA) اندازه‌گیری شد (۱۶).

**روش میکرودایلوشن**

برای مقایسه اثر ضد باکتریایی پالیده‌های کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی از روش میکرودایلوشن استفاده شد. برای تهیه پالیده خام حاصل از کشت جدایه لاکتیکی، کشت حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون آن با ۲۰۳۸۰ xg، دمای ۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (combi 514 R، Hanil، South Korea) گردید. سپس مایع رویی به‌دست‌آمده از فیلتر سرنگی (Jet Biofil، China)

Final Proof

۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. برای تهیه پالیده کشت خنثی‌شده، pH پالیده مذکور با سود یک نرمال تا pH ۷ خنثی گردید. شاخص‌های باکتریایی نیز در محیط کشت Nutrient broth (Germany ،Merck) کشت داده شدند و جمعیت آن‌ها به $۱\times۱۰^{۸}$ cfu/mL رسانده شد. سپس به هر چاهک میکروپلیت، حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر افزوده شد. نمونه کنترل منفی حاوی پالیده خام و شاخص باکتریایی اتوکلاو شده، کنترل مثبت حاوی محیط کشت MRS broth و شاخص باکتریایی موردنظر و نمونه‌های دیگر حاوی پالیده‌های خام و یا خنثی‌شده و هر یک از شاخص‌های باکتریایی موردنظر بودند. درنهایت میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شد و توسط دستگاه خوانش الیزا (Germany ،Sco) در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر جذب‌سنجی صورت گرفت (۱۷).

### تعیین خواص ضد قارچی

برای ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی از روش‌های کشت دولایه و لکه‌گذاری اسپور قارچ استفاده شد.

### روش کشت دولایه

این روش به‌منظور ارزیابی اثر ضد قارچی جدایه لاکتیکی فعال در مقابل دو قارچ شاخص *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* مورداستفاده قرار گرفت. ابتدا با سوآب استریل از کشت فعال جدایه لاکتیکی خطوطی به طول ۳ سانتی‌متر بافاصله متناسب از یکدیگر در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت MRS agar کشیده شد و سپس به مدت ۷۲ ساعت گرم خانه گذاری گردید. برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ‌های شاخص نیز پلیت‌های کشت داده‌شده آن‌ها در محیط YGC agar (Germany ،Merck) به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری گردید. پس از گرم خانه گذاری، اسپورها با استفاده از آب مقطر استریل، شسته و جمع‌آوری گردیدند. شمارش اسپورها نیز با استفاده از لام هموسیتومتر انجام شد و اسپورها تا $۱۰^{۵}$ عدد در هر میلی‌لیتر رقیق گردیدند. سپس مخلوط حاوی یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور با ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت YGC agar بر روی خطوط کشت داده‌شده جدایه لاکتیکی ریخته شد (کشت دولایه) و پس از انعقاد لایه دوم، پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری گردیدند. قطر هاله عدم رشد قارچ در اطراف خطوط کشت داده‌شده جدایه لاکتیکی نیز با نرم‌افزار ImageJ اندازه‌گیری شد (۴).

### روش لکه‌گذاری اسپور قارچ

برای ارزیابی اثر ضد قارچی پالیده خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون جدایه لاکتیکی از این روش استفاده شد. بدین منظور در هر پلیت ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط هر یک از پالیده‌ها و YGC agar با نسبت ۱ به ۹ ریخته شد. از محیط کشت YGC agar بدون پالیده نیز به‌عنوان نمونه کنترل استفاده گردید. در این آزمایش، مرکز هر پلیت با ۳ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور تهیه‌شده در مرحله قبل لکه‌گذاری گردید. سپس پلیت‌ها به مدت ۶ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرم‌خانه‌گذاری شده و رشد کپک‌ها با تعیین قطر کلنی آن‌ها به‌صورت روزانه موردبررسی قرار گرفت (۱۸).

### محاسبات آماری

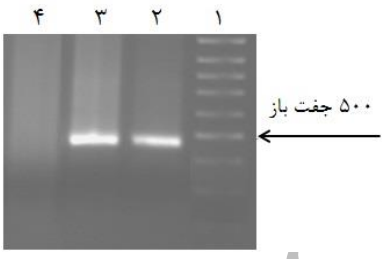
نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه با مقایسات زوجی حداقل اختلاف معنی‌داری (LSD) در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ با سه تکرار و به کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۱,۳ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel نسخه ۲۰۰۷ استفاده شد.

## یافته‌ها

### شناسایی جدایه لاکتیکی

پس از ۴ بار تکرار فرایند مایه‌گیری خمیرترش باثبات نسبی pH و اسیدیته قابل تیتر آن، باکتری اسیدلاکتیک به روشی که قبلاً توضیح داده شد جدا گردید. نتایج آزمون‌های میکروسکوپی و بیوشیمیایی، گرم مثبت، کاتالاز منفی و کروی شکل بودن جدایه را مشخص کرد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده‌شده است الکتروفورز محصولات PCR نیز حاکی از تکثیر اختصاصی توالی هدف با طول ۵۰۰ جفت باز بود. پس از مقایسه نتایج توالی یابی با داده‌های موجود در پایگاه NCBI و استفاده از رویه BLASTn نیز مشخص شد که جدایه لاکتیکی، *ویسلا سیباریا* (*Weissella cibaria*) بود.

Final Proof




**شکل ۱: ژل الکتروفورز محصولات PCR دارای پرایمر اختصاصی با توالی هدف ۵۰۰ جفت باز جهت شناسایی جدایه لاکتیکی سوسپانسیون میکروبی خمیرترش آرد کامل جو (چاهک ۲) در مجاورت مارکر صد جفت بازی (چاهک ۱) و همچنین نمونه‌های کنترل مثبت حاوی DNA حاصل از کشت خالص *Lactobacillus* sp. (چاهک ۳) و کنترل منفی یا فاقد باکتری (چاهک ۴).**

### اثر ضد باکتریایی جدایه *ویسلا سیباریا* به روش انتشار در دیسک

نتایج بررسی اثر ضد باکتریایی *ویسلا سیباریا* به روش انتشار در دیسک نشان داد که بیشترین اثر ضد باکتریایی این جدایه در مقابل *باسیلوس سوبتیلیس* با قطر هاله عدم رشد ۱۱/۴۳۱ میلی‌متر و کمترین مقدار آن در مقابل *اشریشیا کلی* با قطر هاله عدم رشد ۷/۹۲۸ میلی‌متر مشاهده شد. علاوه بر این از بین شاخص‌های باکتریایی موردمطالعه صرفاً بین اثر ضد باکتریایی *ویسلا سیباریا* بر روی دو باکتری مذکور تفاوت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) وجود داشت (جدول ۲).

**جدول ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) شاخص‌های باکتریایی در مجاورت *ویسلا سیباریا* به روش انتشار در دیسک**

| شاخص‌های باکتریایی | *استافیلوکوکوس اورئوس* | *لیستریا منوسیتوژنز* | *اشریشیا کلی* | *باسیلوس سوبتیلیس* |
|---|---|---|---|---|
| *ویسلا سیباریا* | ۹/۱۴۸±۰/۲۹۶ BC | ۱۰/۰۰۴±۰/۸۹۴ AB | ۷/۹۲۸±۰/۷۳۵ C | ۱۱/۴۳۱±۰/۶۸۹ A |

*نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار±انحراف معیار بیان‌شده است. حروف ناهمسان در هر ردیف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

### اثر ضد باکتریایی پالیده‌های کشت *ویسلا سیباریا* به روش میکرودایلوشن

نتایج به‌دست‌آمده از تعیین فازهای رشد لگاریتمی و سکون نشان داد که *ویسلا سیباریا*، ۱۰ ساعت پس از زمان گرم‌خانه گذاری به انتهای فاز رشد لگاریتمی رسید، لذا برای ارزیابی اثر ضد باکتریایی پالیده کشت *ویسلا سیباریا* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون به ترتیب ۸ و ۱۲ ساعت پس از کشت جدایه، پالیده تهیه شد. همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده‌شده است بیشترین اثر بازدارندگی پالیده‌های حاصل از کشت *ویسلا سیباریا* مربوط به پالیده خام فاز لگاریتمی و کمترین آن مربوط به پالیده خنثی‌شده فاز سکون بود. علاوه بر این عمدتاً بین اثر ضد باکتریایی پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از کشت جدایه مذکور در فازهای رشد لگاریتمی و سکون بر روی باکتری‌های شاخص تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). همچنین بر اساس این نتایج، بین اثر بازدارندگی هر پالیده بر روی چهار شاخص باکتریایی نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین اثر بازدارندگی پالیده‌های کشت *ویسلا سیباریا* بر روی *باسیلوس سوبتیلیس* و کمترین اثر بازدارندگی آن‌ها نیز بر روی *اشریشیا کلی* مشاهده شد.

**جدول ۳- درصد کاهش جمعیت (cfu/mL) شاخص‌های باکتریایی در حضور پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *ویسلا سیباریا* به روش میکرودایلوشن**

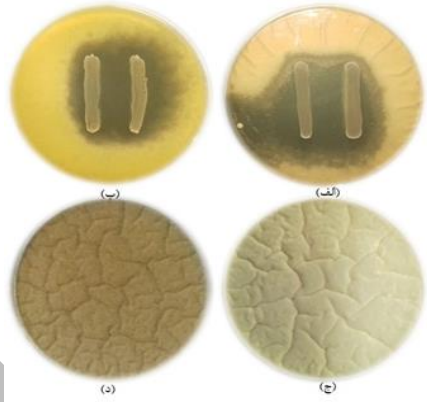
| | شاخص‌های باکتریایی | | | |
|---|---|---|---|---|
| | *استافیلوکوکوس اورئوس* | *لیستریا مونوسیتوژنز* | *اشریشیا کلی* | *باسیلوس سوبتیلیس* |
| پالیده خام فاز لگاریتمی | ۶۷/۵۰۵±۰/۷۱۴ Ac | ۷۴/۴۵۰±۰/۴۹۵ Ab | ۲۳/۶۹۵±۰/۲۴۷ Ad | ۸۱/۵۹۰±۰/۷۹۲ Aa |
| پالیده خنثی فاز لگاریتمی | ۶۱/۸۵۵±۰/۲۰۵ Bc | ۷۰/۴۸۵±۱/۳۲۲ Bb | ۲۰/۱۱۰±۰/۲۸۳ Cd | ۷۳/۰۹۵±۰/۱۷۷ Ca |
| پالیده خام فاز سکون | ۶۵/۳۱۵±۰/۶۷۲ Ac | ۷۱/۹۶۰±۰/۰۱۴ Bb | ۲۱/۶۰۰±۰/۵۵۲ Bd | ۷۷/۰۲۵±۰/۰۹۲ Ba |
| پالیده خنثی فاز سکون | ۵۶/۳۴۰±۱/۵۷۰ Cc | ۶۲/۶۲۵±۰/۷۸۵ Cb | ۱۵/۰۸۵±۰/۱۹۱ Dd | ۶۷/۴۸۵±۰/۶۴۳ Da |

*نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار±انحراف معیار بیان‌شده است. حروف بزرگ ناهمسان در هر ستون و حروف کوچک ناهمسان در هر ردیف، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ می‌باشد.

Final Proof

### اثر ضد قارچی *ویسلا سیباریا* به روش کشت دولایه

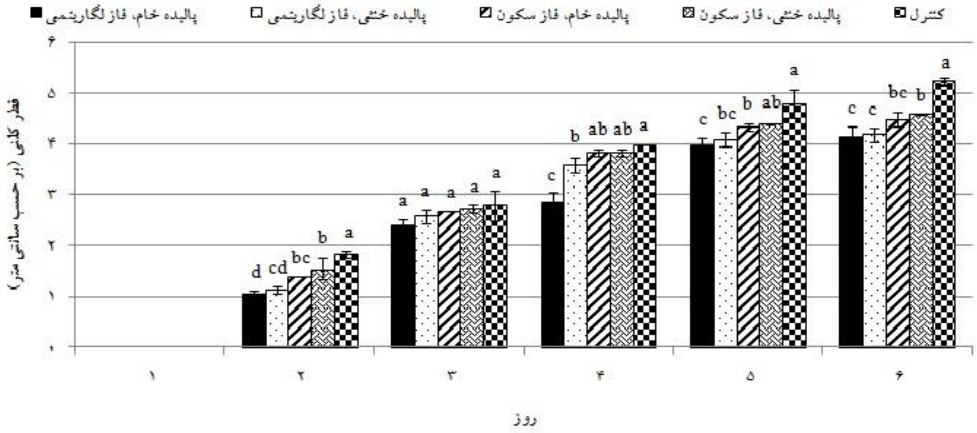
بر اساس نتایج به‌دست‌آمده بین اثر ضد قارچی *ویسلا سیباریا* بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P<۰/۰۵$). اما اثر ضد قارچی این جدایه لاکتیکی بر روی *آسپرژیلوس فلاووس* بیشتر از *آسپرژیلوس نایجر* بود (شکل ۲).



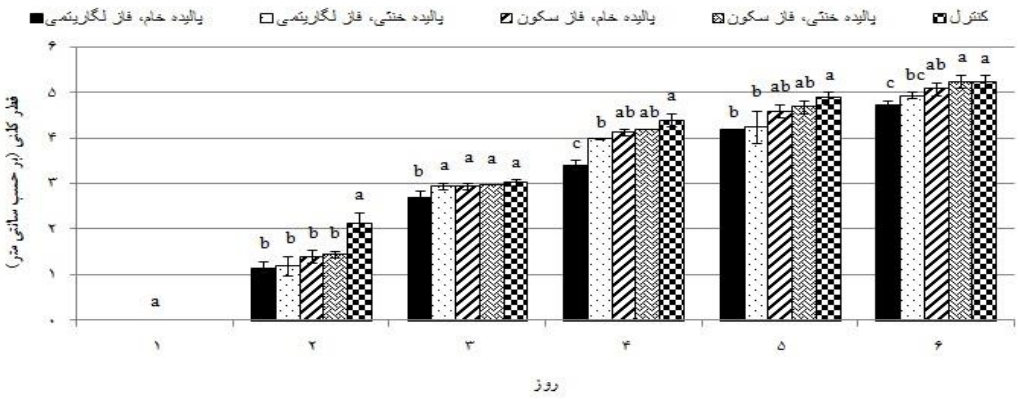

**شکل ۲: هاله عدم رشد *آسپرژیلوس فلاووس* (الف) و *آسپرژیلوس نایجر* (ب) در حضور *ویسلا سیباریا* در مقایسه با نمونه‌های کنترل *آسپرژیلوس فلاووس* (ج) و *آسپرژیلوس نایجر* (د) به روش کشت دولایه.**

### اثر ضد قارچی پالیده‌های کشت *ویسلا سیباریا* به روش لکه‌گذاری اسپور

تعیین میانگین روزانه قطر کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس نایجر* در حضور و عدم حضور پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *ویسلا سیباریا* تا روز ششم که این قارچ‌ها به‌طور کامل، سطح پلیت کنترل را پوشاندند ادامه یافت (شکل‌های ۳ و ۴). بر اساس این نتایج، پالیده خام حاصل از فاز رشد لگاریتمی در مقایسه با سایر پالیده‌ها دارای بیشترین اثر ضد قارچی بود. همچنین در روز اول هیچ رشدی مشاهده نشد، اما از روز دوم، بین میزان رشد کلنی این قارچ‌ها در محیط کنترل نسبت به محیط‌های حاوی پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از کشت جدایه *ویسلا سیباریا* در فازهای رشد لگاریتمی و سکون تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).




**شکل ۳: قطر کلنی *آسپرژیلوس فلاووس* در حضور و عدم حضور (کنترل) پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *ویسلاسیباریا* به روش لکه‌گذاری اسپور. *حروف ناهمسان در هرروز، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.**




**شکل ۴: قطر کلنی *آسپرژیلوس نایجر* در حضور و عدم حضور (کنترل) پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *ویسلاسیباریا* به روش لکه‌گذاری اسپور. *حروف ناهمسان در هرروز، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.**

## بحث

با توجه به نتایج این پژوهش، *ویسلا سیباریا* به‌عنوان یکی از جدایه‌های لاکتیکی غالب خمیرترش آرد کامل جو شناسایی شد. در مطالعاتی که باهدف شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش صورت گرفته نیز حضور *ویسلا سیباریا* تأییدشده است. در این زمینه می‌توان به مطالعه‌ای که Lattanzi و همکاران (۲۰۱۳) برای شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک هیجده نمونه خمیرترش ایتالیایی انجام دادند اشاره کرد که منجر به شناسایی *ویسلا سیباریا* گردید (۱۹). Robert و همکاران (۲۰۰۹) نیز در بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش‌های فرانسوی دریافتند که ۴٪ از باکتری‌های اسیدلاکتیک به گونه *ویسلا سیباریا* تعلق داشتند (۲۰). همچنین مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تنوع باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش سنتی مغولستان منجر به شناسایی *ویسلا سیباریا* گردید (۱۳). De Vuyst و همکاران (۲۰۰۲) نیز در بررسی تنوع زیستی باکتری‌های اسیدلاکتیک خمیرترش، *ویسلا سیباریا* را شناسایی کردند (۲۱)، لذا اگرچه عمده‌ترین باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از خمیرترش به جنس *لاکتوباسیلوس* تعلق دارند، اما جنس *ویسلا* نیز در خمیرترش یافت می‌شود (۲۳، ۲۲).

نتایج حاصل از روش انتشار دیسک نشان داد که *ویسلا سیباریا* از اثر ضد باکتریایی مناسبی برخوردار است. این نتایج با یافته‌های Divya و همکاران در سال ۲۰۱۲ که نشان دادند جدایه لاکتیکی *ویسلا سیباریا* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* دارای اثر بازدارندگی است همخوانی دارد (۲۴). ویژگی بازدارندگی *ویسلا سیباریا* در برابر این میکروارگانیسم‌ها را می‌توان در ابتدا به تولید اسیدهای آلی و علاوه بر این، تولید برخی از پپتیدها و پروتئین‌های ضد میکروبی شناخته‌شده نظیر باکتریوسین‌ها توسط این باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت داد (۲۵).

بر اساس نتایج روش میکرودایلوشن نیز پالیده‌های خام و خنثی‌شده حاصل از فازهای رشد لگاریتمی و سکون *ویسلا سیباریا* دارای اثر ضد باکتریایی بودند. همچنین بر اساس نتایج این پژوهش، بیشترین فعالیت ضد میکروبی این پالیده‌ها در pH اسیدی مشاهده گردید و هر چه pH پالیده عاری از سلول جدایه لاکتیکی به سمت خنثی، سوق داده شد میزان فعالیت ممانعت‌کنندگی آن نیز کاهش یافت. نتایج مطالعات Hashium و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی اثر ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی توسط جدایه لاکتیکی *ویسلا سیباریا* حاکی از آن بود که پالیده فاقد سلول *ویسلا سیباریا* بر روی میکروارگانیسم بیماری‌زای *لیستریا مونوسیتوژنز* دارای اثر ضد میکروبی بود (۲۶). Li و همکاران (۲۰۱۵) نیز با بررسی اثر ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک دریافتند که پالیده حاصل از کشت *ویسلا سیباریا* بر روی *اشریشیا کلی* دارای اثر ممانعت‌کنندگی است (۲۷). در مطالعه Elavarasi و همکاران در سال ۲۰۱۴ نیز فعالیت ممانعت‌کنندگی پالیده حاصل از کشت سویه‌های مختلف *ویسلا سیباریا* بر روی میکروارگانیسم بیماری‌زای *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داده شد (۲۸). نتایج تحقیقات Tabatabaei Yazdi و همکاران در سال ۱۳۹۵ بر روی اثر ضد میکروبی متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان داد که بیشترین فعالیت ضد

Final Proof

میکروبی پالیده‌های حاصل از کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک در pH اسیدی بوده و هر چه pH پالیده عاری از سلول جدایه لاکتیکی به سمت خنثی و قلیایی سوق داده شد میزان فعالیت ممانعت‌کنندگی آن کاهش یافت (۲۹). اسیدلاکتیک و اسید استیک مهم‌ترین عوامل ضد میکروبی باکتری‌های اسیدلاکتیک به شمار می‌آیند (۳۰). با توجه به اینکه خنثی‌سازی پالیده کشت *ویسلا سیباریا* منجر به کاهش اثر بازدارندگی آن شد می‌توان علت کاهش فعالیت ضد میکروبی پالیده کشت این جدایه لاکتیکی را مربوط به مشتق‌های اسیدی تولیدشده و یا باکتریوسین‌هایی دانست که در pH خنثی از فعالیت کمتری برخوردارند (۳۱).

نتایج حاصل از روش کشت دولایه نشان داد که جدایه لاکتیکی *ویسلا سیباریا* دارای اثر بازدارندگی بر روی قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* بود. مطالعه Lan و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثر ضد قارچی *ویسلا سیباریا* را بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داد (۳۲). همچنین Belkacem و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ با بررسی اثر ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک دریافتند که *ویسلا سیباریا* دارای اثر مهارکنندگی بر روی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* است (۳۳) که نتایج مطالعات صورت گرفته با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. اثر ضد قارچی باکتری‌های اسیدلاکتیک نه‌تنها به تولید اسیدهای آلی (اسید استیک و اسیدلاکتیک) مربوط می‌شود بلکه دی‌پپتیدهای حلقوی و ترکیبات فعال نظیر ۴-هیدروکسی فنیل پروپانوئیک اسید، فنیل پروپانوئیک اسید و فنیل لاکتیک اسید نیز در اثر ضد قارچی آن‌ها نقش دارند (۴).

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از روش لکه‌گذاری اسپور نیز پالیده‌های کشت *ویسلا سیباریا* دارای اثر بازدارندگی بر روی قارچ‌های موردمطالعه بودند. Ndagano و همکاران در سال ۲۰۱۱ بامطالعه اثر ضد قارچی پالیده حاصل از کشت *ویسلا سیباریا* بیان کردند که باکتری موردنظر دارای اثر ضد قارچی برعلیه *آسپرژیلوس نایجر* بوده و همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت ضد قارچی *ویسلا سیباریا* به تولید مجموعه‌ای از ترکیبات ضد قارچی مانند ۲-هیدروکسی ۴-متیل پنتانوئیک اسید و اسیدهای آلی مرتبط است (۳۴). Valerio و همکاران نیز در سال ۲۰۰۹ با بررسی اثر ضد قاچی باکتری‌های اسیدلاکتیک به این نتیجه رسیدند که پالیده حاصل از کشت *ویسلا سیباریا* بر روی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* دارای اثر ضد قارچی بود که اثر ضد قارچی این جدایه لاکتیکی در درجه اول به دلیل تولید اسیدهای آلی نظیر اسیدلاکتیک، اسید استیک و اسید فرمیک به وجود می‌آید (۳۵). البته عوامل زیادی بر میزان تأثیرگذاری ترکیبات ضد قارچی تولیدشده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک مؤثر است که از آن جمله می‌توان به pH، زمان گرم‌خانه‌گذاری و نوع متابولیت‌های تولیدی اشاره کرد (۳۶،۳۷).

مطالعه Shah و همکاران در سال ۲۰۱۶ نیز اثر ضد میکروبی باکتری *ویسلا کنفوسا* را تأیید نمود. این محققین دریافتند که *ویسلا کنفوسا* با تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی توانست رشد عوامل میکروبی ناخواسته را مهار کند (۳۸). مطالعه Im و همکاران (۲۰۱۶) بر روی خاصیت ممانعت‌کنندگی پالیده حاصل از کشت *ویسلا کورینسیز* نیز حاکی از آن بود که این باکتری با تولید اسیدهای آلی نظیر اسیدلاکتیک، اسید استیک، اسید فسفریک، اسید سوکسینیک، اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید فرمیک قادر به مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا بود (۳۹). همچنین Kaur و همکاران در سال ۲۰۱۶ اثر مهارکنندگی ترکیبات شبه باکتریوسینی تولیدشده توسط جدایه *ویسلا کنفوسا* را موردمطالعه قرار داده و گزارش نمودند که ترکیبات شبه باکتریوسینی تولیدشده توسط این جدایه در کنار متابولیت‌های ضد میکروبی دیگر همچون اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، پپتیدهای حلقوی و اسیدهای آلی، در بروز اثر ضد میکروبی آن در برابر طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های ناخواسته مؤثر هستند (۴۰).

همواره شناسایی و ارزیابی خصوصیات بالقوه جدایه‌های لاکتیکی از زیست‌بوم‌هایی که فلور میکروبی آن‌ها کمتر موردمطالعه قرارگرفته از اهمیت زیادی برخوردار بوده است. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش نیز می‌توان از *ویسلا سیباریا* جداشده از خمیرترش آرد کامل جو به‌عنوان کشت آغازگر یا کشت همراه در فرآوری مواد غذایی تخمیری و یا پالیده‌های حاصل از کشت این جدایه به‌واسطه برخورداری از قابلیت ضد میکروبی آن به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی در صنایع غذایی و دارویی بهره برد.

Final Proof

**تقدیر و تشکر**

بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان که هزینه انجام این پژوهش را تامین نمودند صمیمانه قدردانی می‌گردد.

**تعارض منافع**

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

## References

1. Cul H, Ozcelik S, Sagdic O, Certel M. Sourdough bread product and *S.cervisiae* isolated from sourdough. Process Biochem 2005;40(2):691-7.
2. Poutanen K, Flander L, Katina K. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. Food Microbiol 2009;26(7):693-9.
3. Magnusson J, Schnürer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. Appl Environ Microbiol 2001;67(1):1-5.
4. Magnusson J, Strom K, Roos S, Sjogren J, Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Lett 2003;219(1):129-35.
5. Gourama H, Bullerman LB. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. J Food Protect 1995;58(11):1249-56.
6. Simsek O, Hilmi Con A, Tulumoglu S. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control 2006;17(4):263-70.
7. Mentes O, Ercan R, Akcelik M. Inhibitor activities of two *lactobacillus* strains, isolated from sourdough, against rope-forming *bacillus* strains. Food Control 2007;18(4):359-63.
8. Corsetti A, Settanni L, Braga TM, Silva Lopes MF, Suzzi G. An investigation of the bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria associated with wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. LWT-Food Sci Technol 2008;41(7):1173-82.
9. Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskericius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control 2013;31(2):539-45.
10. AACC international; American association of cereal chemists. 11th ed. St Paul: 2010. AACC methods 46-30.
11. Zannini E, Garofalo C, Aquilanti L, Santarelli S, Silvestri G, Clementic F. Microbiological and technological characterization of sourdoughs destined for bread-making with barley flour. Food Microbiol 2009;26(7):744-53.
12. Katina K, Sauri M, Alakomi HL, Sandholm TM. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. LWT- Food Sci Technol 2002;35(1):38-45.
13. Zhang J, Liu W, Sun Z, Bao Q, Wang F, Yu J, Chen W, Zhang H. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in traditional sourdoughs collected from western region in inner Mongolia of China. Food Control 2011;22(5):767-74.
14. Ferchichi M, Valcheva R, Pervost H, Onno B, Dousset X. Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. Food Microbiol 2007;24(7-8):678-86.
15. Gulahmadov SG, Abdullaeva NF, Guseinova NF, Kuliev AA, Ivanova IV, Dalgalarondo M, Chobert JM, Haertlee T. Isolation and characterization of bacteriocin-like inhibitory substances from lactic acid bacteria isolated from Azerbaijan cheeses. Appl Biochem Microbiol 2009;45(3):266-71.
16. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. Clin Infec 2009;49(11):1749-55.
17. Lavermicocca P, Valerio F, Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl Environ Microbiol 2003;69(1):634-40.
18. Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. Plos One 2012;7(1):1-7.
19. Lattanzi A, Minervini F, Di Cagno R, Diviccaro A, Antonielli L, Cardinali G, Cappelle S, De Angelis M, Gobbetti M. The lactic acid bacteria and yeast microbiota of eighteen sourdoughs used for the manufacture of traditional Italian sweet leavened baked goods. Int J Food Microbiol 2013;163(2):71-9.

Final Proof

20. Robert H, Gabriel V, Fontagné-Faucher C. Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. Int J Food Microbiol 2009;135(1):53-9.

21. De Vuyst L, Schrijvers V, Paramithiotis S, Hoste B, Vancanneyt M, Swings J, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, Messens W. The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. Appl Environ Microbiol 2002;68(12):6059-69.

22. Lonner C, Welander T, Malin N, Dostalek M. The microflora in a sourdough started spontaneously on typical Swedish rye meal. Food Microbiol 1986;3(1):3-12.

23. Gobbetti M. The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. Trends Food Sci Tech 1998;9(7):267-74.

24. Divya JB, Varsha KK, Nampoothiri KM. Newly isolated lactic acid bacteria with probiotic features for potential application in food industry. Appl Biochem Biotechnol 2012;167(5):1314-24.

25. Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J Food Protect 1989;4(6):384-7.

26. Hashium AJ, Hamza SJ, Hussein N. Antimicrobial activity of bacteriocin produced by *Weissella cibaria* NRIC0136. Al-Kufa J Biol 2010;2(1):1-10.

27. Li D, Ni K, Pang H, Wang Y, Cai1 Y, Jin Q. Identification and antimicrobial activity detection of lactic acid bacteria isolated from corn Stover silage. Asian Australas J Anim Sci 2015;28(5):620-31.

28. Elavarasi V, Pugazhendhi A, Poornima Priyadharsani TK, Valsala H, Thamaraiselvi K. Screening and characterization of *Weissella cibaria* isolated from food source for probiotic properties. Int J Comput Appl 2014;36(1):29-32.

29. Tabatabaei Yazdi F, Vasiee AR, Alizadeh Behbahani B, Mortazavi SA. Diversity of lactic acid bacteria communities in “Ash kardeh" with using 16s rRNA gene sequence analysis and antimicrobial activity evaluation of like-bacteriocin compounds. Iranian J Food Sci Technol 2015;13(53):1-14. [in Persian]

30. Nghe D, Nguyen T. Characterization of antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* Vtcc-B-601. Appl Pharma Sci 2014;4(5): 061-4.

31. Tofangsazan F, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Eshaghi Z. Investigation of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from traditional kordish cheese in comparison with commercial strains. Iran J Med Microbiol 2013;7(3):34-41. [in Persian]

32. Lan W, Chen Y, Wu H, Yanagida F. Bio-protective potential of lactic acid bacteria isolated from fermented wax gourd. Folia Microbiol 2012;57(2):99-105.

33. Belkacem-Hanfi N, Fhoula I, Semmar N, Guesmi A, Perraud-Gaime I, Ouzari HI, Boudabous A, Roussos S. Lactic acid bacteria against postharvest molds and ochratoxin A isolated from stored wheat. Biol Control 2014;76:52-9.

34. Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S, Thonart P. Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. J Food Sci 2011;76(6):305-11.

35. Valerio F, Favilla M, De Bellis P, Sisto A, de Candia S, Lavermicocca P. Antifungal activity of strains of lactic acid bacteria isolated from a semolina ecosystem against *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger* and *Endomyces fibuliger* contaminating bakery products. Syst Appl Microbiol 2009;32(6):438-48.

36. Khorasanchi N, Peighambardoust SH, Hejazi MA, Raafat SA. Effect of freezing and freeze-drying process on the survival of sourdough lactic acid bacteria. Food Res 2011;1(2):247-55. [in Persian]

37. Sadeghi A, Raeisi M, Ebrahimi M, Sadeghi B. Antifungal activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from whole barley sourdough. J Food Qual Hazards Control 2016;3(1):30-6.

38. Shah N, Patel A, Ambalam P, Holst O, Ljungh A, Prajapati J. Determination of an antimicrobial activity of *Weissella confusa*, *Lactobacillus fermentum*, and *Lactobacillus plantarum* against clinical pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in coculture. Ann Microbiol 2016;66(3):1137-43.

39. Im H, Moon JK, Kim WS. Antibacterial activity of supernatant obtained from *Weissella koreensis* and *Lactobacillus sakei* on the growth of pathogenic bacteria. Korean J Agric Sci 2016;43(3):415-23.

40. Kaur R, Tiwari SK. Isolation, identification and characterization of *Pediococcus pentosaceus* LB44 and *Weissella confusa* LM85 for the presence of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS). Microbiol 2016;85(5):540-7.


Final Proof