

ارزیابی ایمنی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران

فاطمه باقری¹، سعید میردامادی^{2*}، مهتا میرزایی³، سید ملیحه صفوی⁴

1- دانشجوی دکتری زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

2- استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

3- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

4- استادیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: 98/08/02 تاریخ پذیرش: 98/09/11)

چکیده

استفاده از کشت‌های آغازگر پروبیوتیک در محصولات تخمیری و در جوامع مختلف در حال گسترش است. تنوع ژنتیکی باعث می‌شود اثرات این باکتری‌ها در جوامع مختلف انسانی، متفاوت و غیر قابل انتظار باشد. بنابراین کنترل ایمنی و ارزیابی عدم بیماری‌زایی آنها اهمیت بالایی دارد. لذا مراکز نظارتی ملزم به کنترل دقیق ایمنی باکتری‌های مورد استفاده در محصولات غذایی هستند. در این پژوهش دو سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی استان‌های اردبیل (گردنه حیران) و خوزستان (شهرستان بهبهان، روستای حسین آباد) در ایران، براساس خواص بیوشیمیایی و مولکولی از طریق آنالیز توالی S 16rRNA شناسایی شده و سپس ایمنی آنها بر اساس دستورالعمل‌های بین‌المللی بخصوص استاندارد اتحادیه اروپا مورد بررسی قرار گرفت. دو سویه شناسایی شده شامل لاکتوباسیلوس فرمنتوم (PTCC1929) و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (PTCC1930) بودند. نتایج بدست آمده، فقدان آنزیم ژلاتیناز، عدم توانایی همولیز خون، عدم توانایی دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه و همچنین عدم وجود هشت ژن موثر بر خواص مهاجمی میکروارگانیسم‌ها شامل *cylB*، *gelE*، *efaA_{fm}*، *efaA_{fs}*، *agg*، *ace*، *cylM*، *cylA* را در باکتری‌های مورد بررسی نشان داد. علاوه بر آن نتایج نشان دادند هر دو جدایه نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، تتراسیکلین، آمپی‌سیلین و ریفاکسیم حساس و نسبت به کانامایسین و سیپروفلوکساسین دارای مقاومت هستند. لاکتوباسیلوس فرمنتوم (PTCC1929) به ونکومایسین مقاوم، در حالیکه لاکتوباسیلوس هلوتیکوس (PTCC1930) نسبت به آن حساس بود. از آنجا که موارد مقاومت به آنتی بیوتیک بر اساس گزارشات متعدد ذاتی هستند، لذا نتایج به دست آمده تایید کننده پتانسیل کاربرد دو سویه جداسازی شده به عنوان استارتر در محصولات لبنی تخمیری می‌باشد و لزوم به کار گیری روش‌های ارزیابی ایمنی باکتری‌های پروبیوتیک را تایید می‌نماید.

کلید واژگان: ارزیابی خطر، باکتری‌های لاکتیکی، پروبیوتیک، کشت آغازگر

*مسئول مکاتبات: mirdamadi@irost.ir

1- مقدمه

امروزه مصرف پروبیوتیک‌ها در جوامع مختلف به سرعت در حال گسترش است. بطوریکه رشد اقتصادی تولید آنها در سال‌های 2009 تا 2014 به بیش از 10 درصد رسیده است [1]. براساس تعریف سازمان بهداشت جهانی (WHO) پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان مناسب، می‌توانند سبب ارتقاء سلامت میزبان گردند [1-3]. این میکروارگانیسم‌ها از طریق اعمال اثرات فیزیولوژیک، تولید متابولیت‌های مناسب و تجزیه مواد مضر می‌توانند اثرات سلامتی بخشی نظیر بهبود سلامت روده، تقویت سیستم ایمنی بدن، جلوگیری از اسهال حاد ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و سرطان، کاهش علائم عدم تحمل لاکتوز، سطح کلسترول و خطر بیماری‌های قلبی عروقی داشته باشند [1, 2].

با گسترش کاربرد پروبیوتیک‌ها در محصولات غذایی مختلف از جمله شیر، ماست، بستنی، پنیر و دوغ، اهمیت کنترل و ارزیابی سلامت بخشی آنها روز به روز افزایش می‌یابد [1]. مصرف این میکروارگانیسم‌ها در جوامع مختلف با تنوع ژنتیکی، می‌تواند دارای اثرات متفاوت و غیر قابل انتظاری باشد و این موضوع مراکز نظارتی را ملزم به کنترل و ارزیابی دقیق ایمنی و بی‌خطر بودن آنها می‌نماید. لذا لازم است پروبیوتیک‌ها بر اساس دستورالعمل‌های FAO/WHO از نظر ایمنی و بیماری‌زایی مورد ارزیابی (Risk and Safety assessment) قرار گیرند [4, 5]. سویه‌های پروبیوتیک باید بی‌خطر، فاقد قدرت بیماری‌زایی و تولید توکسین و دارای منشاء کاملاً مشخص باشند [6]. عبارت علمی‌تر سویه‌ها باید تحت عنوان "بطور کلی ایمن" یا "GRAS¹" طبقه بندی گردند [6-8]. بطور کلی، پروبیوتیک‌ها نباید هیچ یک از خواص باکتری‌های بیماری‌زا از جمله قدرت استقرار و تهاجم به بافت‌های بدن، جایگزینی در لایه‌های زیرین بافت و نفوذ به بدن را از طریق برخی آنزیم‌های گلیکوزیدی و پروتئولیتیکی خاص داشته باشند [9]. تاکنون ارتباط معنی‌داری میان مصرف پروبیوتیک‌ها و بیماری‌های خطرناک مشاهده نشده است [10]. اما گزارشاتی مبنی بر ایجاد عفونت دیواره قلب (توسط برخی پروبیوتیک‌ها از جمله *L. casei*، عفونت خون، عفونت ادراری، برخی عفونت‌های روده‌ای و آبسه در بیماران تحت درمان با دارو، افراد دارای ضعف ایمنی و

نوزادان توسط برخی باکتری‌های لاکتیکی وجود دارند [7, 9-13]. از طرفی گزارشاتی هر چند نادر مبنی بر افزایش میزان مرگ و میر در بیماران مبتلا به ایسکیمی روده‌ای (Bowel Ischemia) (Deasies) و روده تحریک پذیر (Irritable Bowel Syndrome) دریافت کننده مکمل‌های پروبیوتیکی نسبت به بیماران دریافت کننده دارونما وجود دارد [10]. برخی از سویه‌های *انتروکوک*، *باسیلوس* (مانند *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس سابتیلیس*) و *کلستریدیوم بوتیریکوم* نیز به عنوان پروبیوتیک معرفی گردیده‌اند که به دلیل نزدیکی خویشاوندی آنها در طبقه بندی سیستماتیک به انواع بیماری‌زا، افتراق این سویه‌ها و ارزیابی ایمنی آنها بسیار حیاتی است [7, 9].

باکتری‌های لاکتیکی (L.A.B) بعنوان اصلی‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک، دارای سابقه طولانی و ایمن در تولید و مصرف مواد غذایی و نوشیدنی‌های تخمیری هستند [14]. با وجود آنکه بسیاری از آنها جزء باکتری‌های ایمن (GRAS) طبقه‌بندی می‌شوند اما گزارشاتی نیز در خصوص ایجاد بیماری‌های زمینه‌ای و عفونی توسط لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتری‌ها وجود دارد [9]. کاربرد وسیع سویه‌های لاکتیکی در تولید محصولات غذایی پروبیوتیک در جوامع بشری مختلف، لزوم به کارگیری روش‌های مطمئن ارزیابی خطر و سلامتی را برای سویه‌های لاکتیکی جدا شده از منابع مختلف ضروری می‌سازد [14].

تحقیق قبلی ما نشان داد که استفاده از دو سویه باکتریایی جدا شده از محصولات لبنی بومی ایران در تولید شیر تخمیری، باعث بهبود خواص حسی و آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال‌های (DPPH و ABTS) می‌شود [15]. تحقیق حاضر در تکمیل تحقیق قبل و با هدف بررسی ایمنی سویه‌های مورد نظروارزیابی امکان کاربرد آنها در تولید محصولات تخمیری پروبیوتیک و فراسودمند طراحی شده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1 مواد

محیط‌های کشت از شرکت مرک (آلمان)، کیت استخراج DNA از شرکت یکتا تجهیز آزما (تهران، ایران) و سایر مواد مورد استفاده با گرید آزمایشگاهی از شرکت سیگما (Munich, Germany) خریداری شدند.

1. Generally Regarded As Safe

2-2- نگهداری و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی

جدا شده از نمونه‌های لبنی

دو سویه از لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی بومی ایران از استان‌های اردبیل (گردنه حیران) و خوزستان (بهبهان، روستای حسین آباد) انتخاب شدند. سویه‌ها در فریزر -80- درجه سانتی‌گراد در محیط شیر بدون چربی حاوی 15% گلیسرول نگهداری و بر اساس خواص بیوشیمیایی شامل تولید آنزیم کاتالاز و تخمیر قندها [16] و خواص مولکولی شامل آنالیز توالی 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفتند [17, 18].

3-2- استخراج DNA ژنومی

ابتدا سویه‌های لاکتوباسیلوس بر روی محیط MRS² آگار در 37°C کشت داده شدند، سپس DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) استخراج شد. نمونه DNA در 20 °C - نگهداری شده و برای واکنش PCR مورد

استفاده قرار گرفت مخلوط واکنش PCR در حجم 20 میکرولیتر حاوی 50 نانوگرم DNA ژنومی استخراج شده، 1 میکرولیتر پرایمر (20 میکرومولار)، 1 میکرولیتر dNTP (5 میلی‌مولار)، 1 میکرولیتر کلرید منیزیم (1/5 میلی‌مولار) و 0/1 U آنزیم Taq DNA پلیمرز بود. پرایمرهای (سیناژن، تهران، ایران) مورد استفاده و برنامه اجرا شده برای تکثیر قطعه DNA مورد نظر در جدول (1) نشان داده شده است.

Table 1 The program executed to replicate the DNA fragment was adjusted according to the following table (1)

Primers:			
27f: 5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'			
1541r: 5'- AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -3'			
Steps	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	3 '	1
Denaturation	94	45"	35
Annealing	58	60"	
Elongation	72	90"	
Final extension	72	10 '	1

2. De Man, Rogosa and Sharpe,

برنامه اجرا شده برای تکثیر قطعه مورد نظر DNA براساس جدول (1) زیر تنظیم گردید.

خالص‌سازی محصول PCR با کمک کیت GF-1 Clean-up PCR انجام شد. پس از آن، از تکنیک الکتروفورز (30 دقیقه، جریان 80-90 V، ژل آگار 1%) برای تفکیک قطعات تکثیر یافته استفاده شد و قطعه حدود 1500 نوکلئوتیدی بعنوان محصول PCR خالص شده، استفاده گردید.

4-2- تعیین توالی قطعات تکثیر شده ژن S

16rRNA باکتری

محصولات حاصل از تخلیص واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت زیر و با روش اتومات سنجر بر اساس روش دی‌دئوکسی نوکلئوتیدهای فلورسانت و با استفاده از دستگاه ABI 370XL DNA Analyzer تعیین توالی شدند.

27 f : 5'- GAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'
16f358: 5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'
704f: 5'- GTAGCGGTGAAATGCGTAGA- 3'
16r339: 5'- ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG-3'
1505r: 5'- GATACGGCTACCTTGTTACGA-3'

توالی‌های به دست آمده با توالی‌های نوکلئوتیدی موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، Eztaxon، Ribosomal Database . Project مقایسه شدند.

5-2- ارزیابی ایمنی سویه‌ها

ایمنی سویه‌ها با روش‌های فنوتیپی (شامل توانایی همولیز، تولید ژلاتیناز، قدرت دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه و تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها) و ژنوتیپی (بررسی حضور برخی ژن‌های موثر در بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها) مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-5-1-آزمون‌های فنوتیپی

2-5-1-1- فعالیت همولیتیک

توانایی تولید همولیزین، توسط کشت سویه‌های باکتریایی در محیط کشت حاوی 5% خون گوسفند (بلاد آگار) و گرمخانه‌گذاری در دمای 37°C به مدت 24 ساعت بررسی و ایجاد هاله سبز رنگ و شفاف در اطراف کلونی‌ها به ترتیب بعنوان شاخص‌هایی از فعالیت آلفا و بتا همولیتیک در نظر گرفته

شدند [19, 20].

2-1-5-2- آزمون ژلاتیناز

فعالیت ژلاتیناز باکتری ها با کشت در محیط Tod-Hewitt آگار حاوی 3% ژلاتین بررسی شد. برای این منظور کشت 18-24 ساعته از باکتری ها به محیط کشت تلقیح و در دمای 37°C به مدت 24 ساعت گرمخانه گذاری شدند. به منظور اطمینان از عدم تداخل اثر گرمای گرمخانه بر تغییر فرم محیط به حالت مایع، لوله های کشت به مدت 30 دقیقه در دمای یخچال نگهداری و سپس فعالیت ژلاتیناز باکتری ها با ارزیابی جامد یا مایع بودن محیط های کشت ارزیابی گردید [19].

2-1-5-3- آزمون سنجش فعالیت دکربوکسیلان اسیدهای آمینه

ارزیابی فعالیت دکربوکسیلاز در باکتری ها براساس روش Bover-Cid و Holzapfel انجام شد. جهت القاء آنزیم، ابتدا سویه ها در محیط های کشت MRS حاوی 0/1% از هر کدام از اسید آمینه های هیستیدین، لیزین، تیروزین و اورنیتین کشت داده شدند. سپس به محیط کشت حاوی اسید آمینه مورد نظر و بروموکروزول (به عنوان اندیکاتور pH) انتقال و برای مدت 4 روز در شرایط هوازی و در دمای 37°C گرمخانه گذاری شدند. محیط کشت فاقد اسید آمینه به عنوان نمونه کنترل منفی در نظر گرفته شد. حضور هاله بنفش اطراف کلونی ها، نشان دهنده فعالیت دکربوکسیلازی مثبت می باشد. در مورد محیط حاوی اسید آمینه تیروزین، محو شدن هاله رسوبی در اطراف کلونی ها به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد [21].

2-6- تست حساسیت به آنتی بیوتیک (آنتی بیوگرام)

میزان حساسیت و مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک توسط دیسک های حاوی آنتی بیوتیک (پادتن طب) شامل آمپی سیلین (10 میکروگرم)، کانامایسین (30 میکروگرم)، سیپروفلوکسازین

(5 میکروگرم)، جنتامایسین (10 میکروگرم)، پنی سیلین (10 میکروگرم)، ریفامپین (5 میکروگرم)، تتراسایکلین (30 میکروگرم) و ونکومایسین (30 میکروگرم) با استفاده از تست آنتی بیوگرام بررسی شد. برای این منظور دیسک های آنتی بیوتیک بر روی محیط کشت MRS آگار، حاوی سویه های مورد نظر قرار داده شدند. پس از 24 ساعت گرمخانه گذاری در دمای 37°C قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد [22].

2-7-2- آزمون ژنوتیپی**2-1-7-2- حضور ژن های بیماری زا**

به منظور بررسی حضور ژن های موثر در تهاجم میکروارگانیسم های بیماریزا، DNA ژنومی بدست آمده از دو سویه برای حضور ژن های بیماری زا *gelE*، *ace*، *agg*، *efaA_{fs}*، *efaA_{fim}*، *cylA*، *cylM* و *cylB* بررسی شد. فهرست پرایمرهای استفاده شده در این ارزیابی، در جدول 3 ارائه شده است. مخلوط واکنش PCR در حجم 20 میکرولیتر حاوی 100 نانوگرم DNA ژنومی استخراج شده، 1 میکرولیتر پرایمر (1/25 میکرومولار)، 1 میکرولیتر dNTP (0/2 میلی مولار)، 2 میکرولیتر (1/5 میلی مولار کلرید منیزیم) و 0/75 U آنزیم Taq DNA پلیمرز بود. برنامه PCR مطابق برنامه ارائه شده در جدول 1 در 35 سیکل اجرا شد. محصولات PCR با استفاده از روش الکتروفورز (به مدت 30 دقیقه، جریان 70 ولت، غلظت ژل آگار 1/5%) جداسازی و با روش رنگ آمیزی شده با رنگ بارگذاری DNA بررسی شده و با نور UV دستگاه ژل داک (Bio-Rad 1000) مشاهده شدند. مارکر مولکولی DNA استفاده شده 1 kb DNA Ladder بود. ائتروکوکوس فکالیز (PTCC1778) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران و ائتروکوکوس فاشیوم SM09 به عنوان سویه های کنترل مثبت برای بررسی بیان ژن های بیماری زا، در نظر گرفته شدند [19].

Table 2 PCR program for identifying pathogen genes

Step	Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	Time	Number of cycles
Initial denaturation	95	5 min	1
Denaturation	94	1 min	35
Annealing	48-60	1 min	
Elongation	72	1 min	
Final extension	72	10 min	1

Table 3 Primers specification to identify pathogen genes

Gene	Product	sequence (5'-3')	Product size (bp)	Reference
<i>gel E</i>	Gelatinase	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	419	[19]
<i>efaA_{fm}</i>	Cell wall adhesion	F: AACAGATCCGCATGAATA R: CATTTTCATCATCTGATAGTA	735	[19]
<i>efaA_{fs}</i>	Cell wall adhesion	F: GACAGACCCTCACGAATA R: AGTTCATCATGCTGTAGTA	705	[19]
<i>Ace</i>	Collagen adhesion	F: AAAGTAGAATTAGATCCACAC R: TCTATCACATTCGGTTGCG	350	[19]
<i>CylM</i>	Cytolysine	F: CTGATGGAAAGAAGATAGTAT R: TGAGTTGGTCTGATTACATTT	742	[19]
<i>CylA</i>	Cytolysine	F: TGGATGATAGTGATAGGAAGT R: TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA	517	[19]
<i>CylB</i>	Cytolysine	F: ATTCCTACCTATGTTCTGTTA R: AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	843	[19]
<i>Agg</i>	Aggregation protein	F: AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC R: AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	[19]

3-نتایج

3-1-شناسایی سویه

شناسایی ملکولی، یکی از اساسی‌ترین بخش‌ها در بررسی ایمنی سویه‌های باکتریایی است در این تحقیق علاوه بر روش‌های بیوشیمیایی، از تست‌های ملکولی نیز برای شناسایی سویه‌ها استفاده شد. باکتری‌های مورد تحقیق، بر اساس نتایج تست PCR و شناسایی توالی قطعات تکثیر شده ژن 16S rRNA بعنوان دو سویه لاکتوباسیلوس فرمتوم (PTCC1929) و لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (PTCC1930) شناسایی شدند. بطوریکه به ترتیب دارای مشابهت 100% با توالی ژنومی سویه لاکتوباسیلوس فرمتوم CIP102980(T) و سویه لاکتوباسیلوس هلویتیکوس DSM20075 (T) ثبت شده با کدهای

JN175331 و IACLM1000202 در پایگاه NCBI بودند.

3-2-ارزیابی ایمنی باکتری‌ها با روش‌های

فوتیپی

بررسی فعالیت همولیتیک، تجزیه ژلاتین و توانایی دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه‌ی تیروزین، اورنیتین، لیزین و هیستیدین و مقاومت به آنتی‌بیوتیک، از جمله تست‌های فوتیپی مورد بررسی در تحقیق حاضر می‌باشند.

بررسی فعالیت همولیتیک اولین پارامتر ایمنی است که به صورت آزمایشگاهی ارزیابی می‌شود [20]. عدم فعالیت بتاهمولیزی برای پذیرش یک سویه به عنوان پروبیوتیک، ضروری است [23]. نتایج تاییدکننده عدم فعالیت همولیتیک، ژلاتیناز و دکربوکسیلاز در سویه‌های مورد بررسی بود که حاکی از ایمن بودن سویه‌ها دارد.

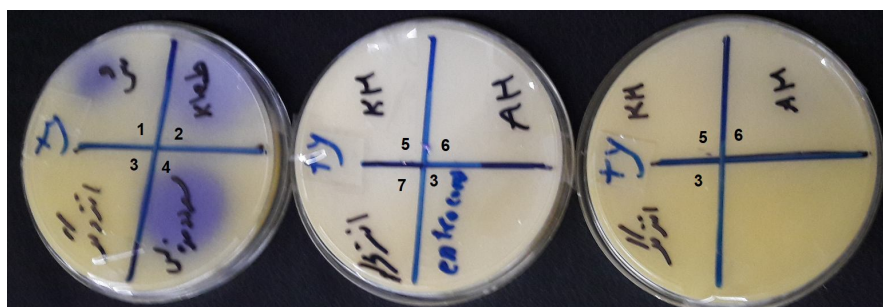


Fig 1 The results of the Tyrosine decarboxylase test: 1- *shigella*(positive control strain) ,2- *Klebsiella* (positive control strain), 3- *Enterococcus*(negative control strain) , 4-*Pseudomonas aeruginosa* (positive control strain), 5- *L. helveticus*, 6- *L. fermentum*, 7- *Enterobacter* (negative control strain).

دکربوکسیلاز در باکتری‌های مورد بررسی بود. در حالیکه در مورد باکتری‌های، کلبسیلا پنومونیه، شیگلا، پروتئوس مورگانی، سودو موناس آئروژنوز، انتروکوکوس فکالیس (NCDC114) بعنوان نمونه‌های کنترل مثبت، و انتروباکتر آگلومرانس و لاکتوباسیلوس پاراپلاتاروم (SM01) به عنوان نمونه‌های کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

3-3- ارزیابی مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک

مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک‌های تتراسکلین، ریفامپین، گروه بتالاکتامی شامل پنی سیلین، آمپی سیلین، آمینو گلیکوزیدها (شامل کانامایسین، جنتامایسین)، گلیکوپپتیدها (ونکومایسین)، فلوروکینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل بر اساس اندازه قطر هاله عدم رشد در جدول 3 ارائه شده است. نتایج نشان دادند که هر دو سویه مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و کانامایسین مقاوم بوده و سویه لاکتوباسیلوس فرمتوم (PTCC 1929) علاوه بر دو آنتی بیوتیک فوق، نسبت به ونکومایسین نیز مقاومت نشان داد. هر دو سویه نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها حساس بودند.

عدم مشاهده هاله سبز رنگ و شفاف در اطراف کلونی باکتری‌های رشد کرده در محیط حاوی خون (بلاد آگار) نشان دهنده عدم فعالیت آلفا و بتا-همولیتیک در سویه‌های مورد بررسی بود. مشاهده هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری‌های استافیلوکوکوس ارئوس، انتروکوکوس فکالیس ATCC(29212) بعنوان نمونه کنترل مثبت، تایید کننده درستی نتایج بود. در تست ژلاتیناز حفظ حالت جامد در محیط کشت حاوی باکتری‌های مورد آزمون بعد از خروج از گرمخانه و نگهداری در شرایط یخچال، نشان دهنده عدم فعالیت آنزیم ژلاتیناز در باکتری‌های مورد نظر بود. در حالیکه در نمونه‌های کنترل حاوی باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس آئروژنوزا، سراسیا مارسنس، استافیلوکوکوس ارئوس بعنوان نمونه‌های کنترل مثبت، محیط کشت در شرایط مشابه به حالت مایع مشاهده شد. عدم بروز هاله بنفش در اطراف کلونی باکتری‌های رشد کرده در محیط حاوی اسید آمینه‌های هیستدین، لیزین و اورنین و همچنین عدم محو شدن هاله رسوبی در اطراف کلنی‌های رشد کرده در محیط حاوی تیروزین، تایید کننده منفی بودن فعالیت

Table 3 Antibigram test results

Antibiotic Bacteria	P	TET	VAN	K	CP	GM	AM	RIF
<i>Lactobacillus fermentum</i>	43.5mm	26.5mm	0	0	0	11mm	38.5mm	29mm
<i>Lactobacillus. helveticus</i>	71mm	53mm	42mm	0	0	16mm	65.5mm	29mm

P:Penicillin, TET:Tetracycline, VAN:Vancomycin, K:Kanamycin, CP:Ciprofloxacin, GM:Gentamicin, AM:Ampicillin, RIF:Rifampicin

The size of the sensitive inhibition zone ≥ 15 mm

The size of the semi-sensitive inhibition zone = 11-15 mm

The size of the resistant inhibition zone ≤ 10 mm

دهنده سلول³ در باکتری‌های مورد نظر بررسی شد [19]. و نتایج در شکل 1 نشان داده شده‌اند. نمونه باکتری انتروکوکوس فکالیس PTCC1778 به عنوان نمونه‌های کنترل مثبت به منظور حذف خطای مربوط به تکنیک آزمایش استفاده شد. همانطور که نتایج نشان می‌دهند ژنوم دو سویه باکتری مورد بررسی فاقد ژن-های بیماری‌زای مورد مطالعه بودند.

3-4- ارزیابی ایمنی باکتری‌ها با روش ژنوتیپی

علاوه بر آن به منظور بررسی دقیق‌تر، وجود یا عدم وجود ژن‌های مسئول تهاجم به بافت‌های بدن میزبان شامل ژن‌های تولید ژلاتیناز، تولید کننده عوامل اتصال دهنده باکتری به دیواره سلول، اتصال دهنده باکتری به کلاژن سلول میزبان، تولید توکسین‌های لیز کننده سلول (سیتولیزین) و پروتئین‌های تجمع

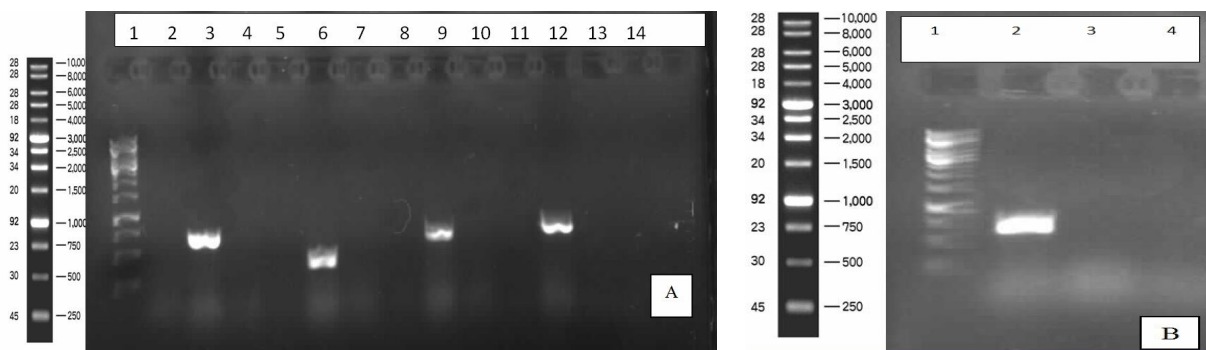


Fig 2 (A). PCR gel electrophoresis image for *efaA_{fs}*, *gelE*, *cylM* and *cylB* genes. Lane 1: The molecular weight marker (DNA ladder 1kb), lane 2: negative control, lane 3: *E. faecalis* PTCC1778 positive control strain for *efaA_{fs}* gene, lane 4: *Lactobacillus fermentum* strain, lane 5: *Lactobacillus helveticus* strain, lane 6: *E. faecalis* PTCC1778 positive control strain for *gelE* gene, lane 7: *Lactobacillus fermentum* strain, lane 8: *Lactobacillus helveticus* strain, lane 9: *E. faecalis* 1778 PTCC positive control strain for *cylM* gene, lane 10: *Lactobacillus fermentum* strain, lane 11: *Lactobacillus helveticus* strain, lane 12: *E. faecalis* 1778 PTCC positive control strain for *CylB* gene, lane 13: *Lactobacillus fermentum* strain, lane 14: *Lactobacillus helveticus* strain. **(B).** PCR gel electrophoresis image for *efaA_{fm}* gene. Lane 1: The molecular weight marker (DNA ladder 1kb), Lane 2: *E. faecium* positive control strain for the *efaA_{fm}* gene, lane 3: *Lactobacillus fermentum* strain, lane 4: *Lactobacillus helveticus* strain.

4- بحث

فعالیت آلفا همولیتیک را برای 9 سویه از 33 باکتری اسید لاکتیک گزارش کردند اما در مورد هیچکدام از سویه‌های باکتریایی، فعالیت بتا همولیزی گزارش نشد [25]. محققین دیگر نیز سویه-های لاکتوباسیل جدا شده از محصولات بومی ایرانی نظیر ماست و چال (نوشیدنی سنتی تخمیری شیر شتر) را فاقد فعالیت بتا همولیتیک گزارش کردند [5, 7].

علاوه بر آن، توانایی همولیتیک باکتری‌ها با روش ژنوتیپی و از طریق ارزیابی وجود یا عدم وجود ژن‌های مسئول مورد ارزیابی قرار گرفت. سیتولیزین تولید شده توسط باکتری‌های مهاجم، عامل همولیز گلوبول قرمز می باشد. و تولید سیتولیزین نقش اساسی در شدت بیماری اندوکاردیت و اندوفتالمیت در مدل‌های حیوانی و بیماری‌های انتروکوککی در انسان دارد. اپرون سیتولیزین متشکل از ژن‌های *cylM*, *cylA*, *cylL_S*, *cylB*, *cylL_L* است که در بین آنها ژن‌های *cylL_S* و *cylL_L* جزء ژن‌های ساختاری هستند. محصول ژن *cylM*، عامل انجام تغییرات پس از ترجمه و محصول ژن *cylB* یک کاست انتقال دهنده متصل شونده به ATP^4 بوده و مسئول انتقال سیتولیزین و در نتیجه فعالیت همولیتیک آن است و در نهایت محصول تولید شده توسط پروتئین حاصل از ژن *cylA* برش خورده و به فرم فعال تبدیل

با وجود ایمن بودن اغلب سوش‌های باکتری‌های لاکتیکی که تا به حال شناسایی شده‌اند، گزارشات متعددی از وجود عوامل بیماری‌زا در باکتری‌های لاکتیکی جدا شده از غذاهای سنتی وجود دارد که باعث بروز خطر عفونت توسط این گروه از باکتری‌ها شده است [24]. فعالیت همولیتیک یکی از مهم‌ترین فاکتورهای تهاجمی در باکتری‌های بیماری‌زا است. به طوریکه سویه‌های میکروبی دارای فعالیت بتا همولیتیک، با تولید همولیزین، باعث لیز شدن سلول‌های خونی می‌شوند. بنابراین سویه‌های جداسازی شده، از نظر فعالیت همولیتیک به عنوان اولین پارامتر کلیدی در ارزیابی ایمنی باکتری‌های پروبیوتیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. لیز شدن خون روی محیط بلاد آگار باعث شفاف شدن محیط پیرامون کلنی‌ها می‌گردد. نتایج آزمون همولیز لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس هلوتیکوس جدا شده در تحقیق حاضر، نشان دهنده عدم فعالیت آلفا و بتا همولیتیکی سویه‌های باکتریایی بود [25]. در تحقیق دیگری فعالیت آلفا همولیتیک باکتری‌های لاکتوباسیلوس فرمنتوم A 0-25 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم A 12-18 جدا شده از خمیر ارزن در غرب افریقا مثبت و فعالیت بتا همولیتیک آنها منفی گزارش شد [26]. آدی‌مپونگ و همکاران (2012). نیز مثبت بودن

4. ATP -binding cassette transporter

نظر در توالی ژنومی به صورت خاموش می باشد [7]. وجود ژن آنزیم ژلاتیناز و عدم فعالیت آنزیم ژلاتیناز در شرایط آزمایشگاهی در ویسلا ویریدسنس [32] و وجود همزمان ژن و فعالیت ژلاتیناز در مورد *انتروکوکوس فاشیوم* و *لوکونوستوک لاکتیس* و *انتروکوکوس فاشیوم* گزارش گردید [7].

فعالیت آنزیم های دکربوکسیلاز تولید شده توسط باکتری های لاکتیکی می تواند منجر به تولید آمین های بیوژنیک در محصولات تخمیری حاوی پروتئین شود. حضور آمین های بیوژنیک در غذاهای تخمیری مانند پنیر، شراب، آب جو، سوسیس و ماهی در بالاترین سطح به میزان 100-1000 میلی گرم در یک کیلوگرم پیامدهای بهداشتی ناخواسته ای نظیر میگرن، زخم معده و روده و یا پاسخ های آلرژیک برای مصرف کننده در پی خواهد داشت. از اینرو وجود آنها می تواند به عنوان شاخص آلودگی میکروبی غذا در نظر گرفته شود [33]. بنابراین لازم است سویه های باکتریایی جدید قبل از استفاده در فرمولاسیون غذایی از نظر توانایی تولید آنزیم های دکربوکسیلاز مورد ارزیابی قرار گیرند [34]. از این رو در این تحقیق، امکان تولید آمین های بیوژنیک هیستامین، تیرامین، کاداورین و پوترسین توسط سویه های باکتری مورد نظر، به ترتیب از اسید آمینه های هیستیدین، تیروزین، لیزین و اورنیتین موجود در محیط کشت بررسی شد و نتایج حاصله بیانگر عدم توانایی باکتری ها در تولید آمین های بیوژنیک مذکور بود. در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است که لاکتوباسیلوس پتوسوس (22C) جدا شده از ماست سنتی ایرانی [5]، سویه لاکتوباسیلوس فاشیوم *KH2* جدا شده از خامه [4] فاقد آنزیم های دکربوکسیلاسیون بوده اند. پرادان و همکاران (2019) نیز سویه های لاکتوباسیلوس پلانناروم

MTCC 5690 و لاکتوباسیلوس فرمنتوم MTCC را فاقد فعالیت دکربوکسیلازی و دکربوکسیلاسیون آمینو اسیدهای تیروزین، هیستیدین، لیزین، یا اورنیتین گزارش کردند. در حالیکه سلیمانزاده و همکاران (2017)، از بین 12 سویه های جدا شده از چال (شیر شتر تخمیری سنتی ایران) شامل لاکتوباسیل ها، *انتروکوکوس* ها، *لوکونوستوک* و ویسلا، در مورد دو سویه *انتروکوکوس* و *لوکونوستوک*، فعالیت تیروزین دکربوکسیلاز را مثبت گزارش کردند و نتیجه مطالعه آنها و تحقیقات مشابه دیگر، تایید کننده اهمیت بررسی این ویژگی در تایید ایمنی سویه های

می شود [27، 28]. در تحقیق حاضر وجود و عدم وجود سه ژن اصلی *cylA*، *cylB* و *cylM* در باکتری های مورد نظر و با تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که دو سویه جدا شده فاقد ژن های مورد بررسی هستند. لذا همانطور که عدم فعالیت همولیتیک باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت به اثبات رسید، نتایج بررسی ژنوتیپی و ارزیابی ژن های مسئول نیز، تایید کننده نتیجه فوق بودند.

علاوه بر آن توانایی تولید آنزیم ژلاتیناز در سویه های باکتریایی به عنوان شاخص دیگر در ارزیابی ایمنی، مورد سنجش قرار گرفت. ژلاتیناز جزء گروه آنزیم های متالوآندوپتیداز خارج سلولی یا متالوپروتئینازها تقسیم بندی می شود. این گروه از آنزیم ها قادر به هضم ژلاتین و ترکیباتی مانند فرومون، کلاژن، کازئین و فیبرینوژن می باشند. آنزیم ژلاتیناز تولید شده توسط میکرو ارگانیسم ها، ژلاتین را به ترکیبات ساده تر نظیر پلی پتید، پپتید و آمینو اسید هیدرولیز می کند که این ترکیبات می توانند از غشای سلولی عبور کرده و توسط میکروارگانیسم ها مورد استفاده قرار گیرند. از طرفی فعالیت ژلاتیناز توسط باکتری ها در روده منجر به از هم پاشیدن لایه مخاطی روده و برهم زدن نظم موجود و آغاز مسیرهای عفونت زایی می شود. حضور ژلاتیناز در چندین باکتری از جمله *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *کلوستریدیوم پرفرنژنجنس* و *سراثیا مارسسنس* گزارش شده است. عدم وجود فعالیت ژلاتیناز توسط باکتری ها، یکی از معیارهای غیر تهاجمی شناخته شدن سویه مورد نظر می باشد [29]. علاوه بر بررسی توانایی تولید آنزیم ژلاتیناز به صورت فنوتیپی، این ویژگی به صورت ژنوتیپی و با بررسی وجود و عدم وجود ژن *gel E* در ژنوم سویه های مورد مطالعه، بررسی گردید و نتایج حاکی از عدم وجود ژن های مذکور بود. در مطالعات دیگری نیز این ویژگی در سویه های باکتری های اسید لاکتیک به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی شده است [7، 30، 31]. بررسی همزمان فنوتیپ و ژنوتیپ یک صفت، این اطمینان را بوجود می آورد که عدم تولید آنزیم توسط باکتری مورد نظر، نتیجه خاموش شدن ژن به دلیل عوامل مختلف نظیر موتاسیون نمی باشد و بنابراین احتمال برگشت و فعال شدن آن وجود ندارد. در حالیکه نتایج برخی از مطالعات نشان دهنده عدم فعالیت ژلاتیناز در ارزیابی آزمایشگاهی ولی وجود ژن مورد

باکتری‌های اسید لاکتیکی است [7].

علاوه بر ژن‌های مرتبط با ویژگی‌های فنوتیپی مورد نظر در این تحقیق، وجود ژن‌های بیماری‌زای دیگری نیز در مورد باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در حالیکه وجود ژن‌های اتصال به رستپورهای سلولی در پروبیوتیک‌ها از ویژگی‌های مثبت تلقی می‌گردد اما وجود ژن‌های عامل اتصال به کلاژن و فاکتورهای اتصال سلول‌ها به یکدیگر (cell aggregation) از ویژگی‌های میکروارگانیسم‌های پاتوژن می‌باشند. لذا بررسی ویژگی‌های فوق اهمیت بالایی در ارزیابی خواص تهاجمی باکتری‌ها به بافت دارند. ژن‌های $efaA_{fs}$ و $efaA_{fm}$ از مهمترین ژن‌های تهاجمی و مسئول چسبندگی دیواره سلولی در *انتروکوکوس*‌ها به شمار می‌روند. نقش بیماری‌زایی ژن $efaA_{fs}$ در مدل‌های حیوانی نیز اثبات شده است [35]. پروتئین *ace* در باکتری *انتروکوکوس فکالیس* محصول ژن *ace* و مسئول اتصال به کلاژن و لامینین و مهار سیستم ایمنی میزبان است [36, 37]. مطابق دستورالعمل‌های اتحادیه اروپا، از ویژگی‌های مهم در ارزیابی پتانسیل باکتری‌های اسیدلاکتیک بعنوان پروبیوتیک، وجود یا عدم وجود ژن‌های مذکور در ژنوم باکتریایی مورد نظر می‌باشد [38]. نتایج تحقیق حاضر حاکی از عدم وجود ژن‌های تهاجمی مورد بررسی در ژنوم باکتری‌های *لاکتوباسیلوس فرمتوم* (PTCC 1929) و *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس* (PTCC 1930) بود. در حالیکه سلیمان زاده و همکاران (2017) وجود حداقل یکی از ژن‌های ace ، $efaA_{fm}$ ، $efaA_{fs}$ را در برخی از سویه‌های *لاکتوباسیل* جدا شده از چال گزارش کردند.

یکی دیگر از ژن‌های مهم عامل بیماری باکتری‌ها و مورد بررسی در این تحقیق ژن *agg* پروتئین تجمع دهنده سلول می‌باشد. گزارشات متعددی در مورد وجود آن در سویه‌های جدا شده از نمونه‌های انسانی و لبنی *انتروکوک*‌ها و *لاکتوباسیل*‌ها وجود دارد [39, 40]. اما پایا و مانا (در سال 2003) گزارش نمودند که از 40 سویه *انتروکوک* جدا شده از محصولات لبنی، هیچ کدام از جدایه‌ها حاوی این ژن نبودند زومیتی همکاران (2018) در تحقیق صورت گرفته بر روی *انتروکوک فاشیوم* جدا شده از نوعی گوشت تخمیری گزارش کردند بجز یک جدایه (*انتروکوک*

فاشیوم (MZFI)، سایر سوش‌ها فاقد ژن *agg* بوده اند. سویه‌های مورد بررسی در این پژوهش، جدا شده از محصولات لبنی نیز فاقد ژن اتصال (*agg*) ارزیابی شدند.

فقدان عوامل بیماری‌زا به تنهایی ایمنی *لاکتوباسیل* را تضمین نمی‌کند و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز فاکتوری منفی در ارزیابی باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد [24]. وجود ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در صورتی که دارای فاکتورهای ژنتیکی قابل انتقال نظیر پلاسمید و ترانسپوزون باشند، از اهمیت خاصی برخوردارند زیرا این باکتری‌ها می‌توانند، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به باکتری‌های بیماری‌زای دیگر موجود در دستگاه گوارش انتقال داده و باعث مشکل در درمان آنتی‌بیوتیکی گردند [1]. بنابراین دو سویه باکتری، از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق، نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی مهارکننده سنتز دیواره سلولی شامل پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی جنتامایسین، تتراسایکلین و ریفاپمپین حساس بوده‌اند [22]. گزارشات زیادی نیز حساسیت و مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک را به آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و جنتامایسین و خانواده بتالاکتام گزارش نموده‌اند [5, 7, 22].

با وجود حساسیت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، هر دو سویه نسبت به کانامایسین و سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند و باکتری *لاکتوباسیلوس فرمتوم* (PTCC 1930) علاوه بر دو آنتی‌بیوتیک فوق، نسبت به ونکومایسین نیز مقاوم بود.

کانامایسین جزء آمینوگلیکوزیدها است و طیف اثر آن بروی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از طریق مهار سنتز پروتئین می‌باشد [1]. کانامایسین با تداخل در پروتئین‌سازی از طریق اتصال به زیر واحد 30S ریبوزوم باکتری مانع از رشد و تکثیر باکتری می‌گردد. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *لاکتوباسیلوس و انتروکوک*، با مکانیسم‌های متفاوتی مانع از اتصال کانامایسین به 16 S rRNA و DNA جیراز می‌گردند. [41]. یکی دیگر از مکانیسم‌های ممکن در مقاومت نسبت به کانامایسین، فقدان سیتوکروم انتقال دهنده الکترون می‌باشد [26] [42]. در گزارشات قبلی مقاومت به این آنتی‌بیوتیک در باکتری‌های لاکتیکی، ذاتی گزارش شده است و بنابراین در اینصورت، خطر انتقال ژن به

گای موندن (2013) نشان داد تغییر ساختاری مانع اتصال و نکومایسین و در نتیجه مقاومت به آنتی بیوتیک می شود [46]. با این حال گزارشاتی نیز در خصوص حساسیت برخی از باکتری های اسید لاکتیک نظیر لاکتوباسیلوس پتوسوس 22C جدا شده از ماست سنتی نسبت به و نکومایسین وجود دارد [5]. با توجه به گزارشات متعدد مبنی بر ذاتی بودن این مقاومت در باکتری های لاکتیکی، این احتمال مطرح می گردد که در مورد باکتری های مورد تحقیق نیز این ویژگی ذاتی بوده و در اینصورت نگرانی از انتقال ژن به سایر سوش های باکتریایی متفی خواهد بود.

4- نتیجه گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر علاوه بر تاکید بر اهمیت ارزیابی کامل خطر در سویه های انتخابی بعنوان کشت آغازگر و پروبیوتیک، نشان داد دو سویه باکتریایی جداسازی از محصولات لبنی بومی ایران با پتانسیل سلامت بخشی فاقد قدرت بیماری زایی از طریق ویژگی های مورد بررسی در این تحقیق هستند. با توجه به اثرات سلامت بخشی این باکتری ها که در تحقیقات قبلی ما به آنها پرداخته شده است، به نظر می رسد باکتری های فوق دارای پتانسیل استفاده به عنوان استارتر و یا احتمالاً باکتری های پروبیوتیک در تولید محصولات لبنی سلامت بخش باشند.

5- منابع

- [1] Wong, A., Ngu, D. Y. S., Dan, L. A., Ooi, A., Lim, R. L. H. 2015. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. *Nutrition Journal*. 14(1): 95.
- [2] Zheng, M., Zhang, R., Tian, X., Zhou, X., Pan, X., Wong, A. 2017. Assessing the risk of probiotic dietary supplements in the context of antibiotic resistance. *Frontiers in microbiology*. 8: 908.
- [3] Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. R., Rowland, I. 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*. 18(5): 530-8.
- [4] Bhardwaj, A., Gupta, H., Kapila, S., Kaur, G., Vij, S., Malik, R. K. 2010. Safety assessment and evaluation of probiotic

سایر سوش های باکتریایی وجود ندارد [25] [41]. سیپروفلوکساسین جزء فلوروکینولون ها طبقه بندی می شود و بر باکتری های گرم مثبت و گرم منفی موثر می باشد [1]. سلیمانزاده و همکاران (2017) نیز مقاومت سویه های لاکتوباسیلوس گاسری SM05، لاکتوباسیلوس پلانتاروم SM06 و لاکتو باسیلوس کفیری SM02 را نسبت به سیپروفلوکساسین گزارش کردند [7]. نتایج مطالعه هومل و همکاران (2007) بر روی سویه های باکتری های لاکتیکی مورد استفاده برای تولید سوسیس های تخمیر شده، سویه های پروبیوتیک و استارترهای ماست و پنیر نشان داد که مقاومت به سیپروفلوکساسین به صورت ذاتی و به دلیل جهش در ژن های *gyrA* و *parC* (مسئول سنتز یکی از زیر واحدهای DNA جیراز و سنتز یکی از زیر واحدهای توپوایزومراز IV) بروز می کند [14]. در مطالعه شارما و همکاران حساسیت آنتی بیوتیکی 30 جدایه شناسایی شده از 19 محصول تجاری از جمله لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی، اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس رامنوسوس لاکتوباسیلوس فرمنتوم مورد ارزیابی قرار گرفته است. اکثر جدایه ها به چندین آنتی بیوتیک، از جمله و نکومایسین، کانامایسین، مقاومت کمتر و در برابر توبرامایسین، جنتامایسین، آمپی سیلین، متی سیلین، پنی سیلین، تتراسیکلین، آزیترومایسین، کلرامفنیکل و نوویوسین مقاومت بیشتری را نشان داده اند [22]. همانطور که در مورد کانامایسین اشاره شد، در صورت ذاتی بودن مقاومت باکتری های لاکتیکی به آنتی بیوتیک ها، آنطور که در مورد اکثر باکتری های لاکتیکی گزارش شده است، این خاصیت یک ویژگی منفی از نظر تخریب جمعیت نرمال روده ای در بیماران مصرف کننده آنتی بیوتیک محسوب نمی شود [22، 43]. و نکومایسین نیز جزء گلیکوپپتیدها است و طیف اثر آن بروی باکتری های گرم مثبت و منفی بخصوص استافیلوکوکوس اورئوس از طریق مهار سنتز دیواره می باشد [1]. مقاومت ذاتی به و نکومایسین در باکتری های اسید لاکتیک در پژوهش های متعددی گزارش شده است [22، 25]. مقاومت به گلیکوپپتیدها (و نکومایسین) را می توان به تغییر در دیواره سلولی ارتباط داد. این تغییر ساختاری به دلیل جایگزینی D-آلانین پنتاپپتید مورامیل دیواره سلول به وسیله D-لاکتات [44، 45]. (مقاومت بالا) یا D-سرین (مقاومت پایین) در ساختارهای شیمیایی پپتید و گلیکان می باشد [22]. مطالعه

- bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 73(3): 730-9.
- [15] Bagheri, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., Safavi, M., 2019, Production of functional fermented milk by Lactobacilli Isolated from traditional Iranian dairy products, *Innovative food technologies*, 7(2): 243-255.
- [16] Kandler O, N, W. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe, ME, Holt JG (eds) Williams and Wilkins, USA.
- [17] Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., et al. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International journal of systematic and evolutionary microbiology.* 62(3): 716-21.
- [18] Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., et al. 2013. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic acids research.* 42(D1): D633-D42.
- [19] Eaton, T. J., Gasson, M. J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol.* 67(4): 1628-35.
- [20] Carasi, P., Díaz, M., Racedo, S. M., De Antoni, G., Urdaci, M. C., Serradell, M. d. I. Á. 2014. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *BioMed research international.* 2014.
- [21] Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., Singh, R. 2016. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety.* 36(1): 38-51.
- [22] Eaton, T. J., Gasson, M. J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 67(4): 1628-35.
- [23] Balamurugan, R., Chandragunasekaran, A. S., Chellappan, G., Rajaram, K., Ramamoorthi, G., Ramakrishna, B. S. 2014. Probiotic potential of lactic acid bacteria present in home made curd in southern India. *The Indian journal of medical research.* 140(3): 345.
- potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *International journal of food microbiology.* 141(3): 156-64.
- [5] Motahari, P., Mirdamadi, S., Kianirad, M. 2017. Safety evaluation and antimicrobial properties of *Lactobacillus pentosus* 22C isolated from traditional yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization.* 11(3): 972-8.
- [6] Szkaradkiewicz, A. K. 2013. Probiotics and prebiotics. *Journal of Biology and Earth Sciences.* 3(1): 42-7.
- [7] Soleymanzadeh, N., Mirdamadi, S., Kianirad, M. 2017. Incidence of virulence determinants and antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional fermented camel milk (Chal). *Journal of Food Biosciences and Technology.* 7(2): 1-8.
- [8] Doron, S., Snyderman, D. R. 2015. Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases.* 60(suppl_2): S129-S34.
- [9] Gueimonde, M., Ouwehand, A. C., Salminen, S. 2004. Safety of probiotics. *Scandinavian Journal of Nutrition.* 48(1): 42-8.
- [10] Sanders, M. E., Akkermans, L. M., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspurger, G., et al. 2010. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microbes.* 1(3): 164-85.
- [11] Besselink, M. G., van Santvoort, H. C., Buskens, E., Boermeester, M. A., van Goor, H., Timmerman, H. M., et al. 2008. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet.* 371(9613): 651-9.
- [12] Salminen, M. K., Tynkkynen, S., Rautelin, H., Saxelin, M., Vaara, M., Ruutu, P., et al. 2002. *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clinical Infectious Diseases.* 35(10): 1155-60.
- [13] Kothari, D., Patel, S., Kim, S.-K. 2019. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 111: 537-47.
- [14] Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H., Franz, C. M. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid

- Biotechnology. (9).
- [32] Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., de Melo Franco, B. D. 2016. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology*. 7: 863.
- [33] Burdychova, R., Komprda, T. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiology Letters*. 276(2): 149-55.
- [34] Pradhan, D., Singh, R., Tyagi, A., Rashmi, H., Batish, V., Grover, S. 2019. Assessing safety of *Lactobacillus plantarum* MTCC 5690 and *Lactobacillus fermentum* MTCC 5689 using in vitro approaches and an in vivo murine model. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 101: 1-11.
- [35] Togay, S. O., Keskin, A. C., Acik, L., Temiz, A. 2010. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J Appl Microbiol*. 109(3): 1084-92.
- [36] Sillanpaa, J., Martinez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., et al. 2010. Characterization of the collagen-binding S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J Bacteriol*. 182(22): 6440-50.
- [37] Joghataei, M., Yavarmanesh, M., Dovom, M. R. E. 2017. Safety Evaluation and Antibacterial Activity of Enterococci Isolated from Lighvan Cheese. *Journal of Food Safety*. 37(1): e12289-n/a.
- [38] Goktepe, I., Juneja, V. K., Ahmedna, M. 2005. Probiotics in food safety and human health: CRC Press.
- [39] Miljkovic, M., Strahinic, I., Tolinacki, M., Zivkovic, M., Kojic, S., Golic, N., et al. 2015. AggLb is the largest cell-aggregation factor from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGNJ1-64, functions in collagen adhesion, and pathogen exclusion in vitro. *PLoS One*. 10(5): e0126387.
- [40] Fisher, K., Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. 155(6): 1749-57.
- [41] Cisneros, Y. M. A., Ponce-Alquicira, E. 2018. Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria.
- [24] Zheng, W., Zhang, Y., Lu, H.-M., Li, D.-T., Zhang, Z.-L., Tang, Z.-X., et al. 2015. Antimicrobial activity and safety evaluation of *Enterococcus faecium* KQ 2.6 isolated from peacock feces. *BMC biotechnology*. 15(1): 30.
- [25] Adimpong, D. B., Nielsen, D. S., Sørensen, K. I., Derkx, P. M., Jespersen, L. 2012. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC microbiology*. 12(1): 75.
- [26] Owusu-Kwarteng, J., Tano-Debrah, K., Akabanda, F., Jespersen, L. 2015. Technological properties and probiotic potential of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from West African fermented millet dough. *BMC microbiology*. 15(1): 261.
- [27] Semedo, T., Almeida Santos, M., Martins, P., Silva Lopes, M. F., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., et al. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. *J Clin Microbiol*. 41(6): 2569-76.
- [28] Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T., Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R., et al. 2004. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(10): 4473-9.
- [29] Pooja Thakkar, H. A. M., J.B.Prajapati. 2015. Isolation, characterization and safety assessment of lactic acid bacterial isolates from fermented food products. *International journal of current microbiology and applied sciences*. 4(4): 713-25.
- [30] Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I., et al. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International journal of food microbiology*. 88(2-3): 291-304.
- [31] Sieladie, D. V., Zambou, N. F., Kaktcham, P. M., Cresci, A., Fonteh, F. 2011. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the western highlands of Cameroon. *Innovative Romanian Food*

- microbiology. 24(6.۷۰-۵۵۹):
- [45] Pisano, M. B., Viale, S., Conti, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, M. P., et al. 2014. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. *BioMed research international*. 2014.
- [46] Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., Margolles, A. 2013. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*. 4: 202.
- [42] Abriouel, H., Muñoz, M. d. C. C., Lerma, L. L., Montoro, B. P., Bockelmann, W., Pichner, R., et al. 2015. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International*. 78: 465-81.
- [43] Zhou, J., Pillidge, C., Gopal, P., Gill, H. 2005. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International journal of food microbiology*. 98(2): 211-7.
- [44] Ammor, M. S., Flórez, A. B., Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food*

Risk Assessment of Isolated *Lactobacill* from Traditional Iranian Dairy Products

Bagheri, F.¹, Mirdamadi, S.^{2*}, Mirzaei, M.³, Safavi, M.⁴

1. Ph.D student, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
4. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

(Received: 2019/10/24 Accepted: 2019/12/02)

The application of probiotic starter cultures in fermented products is expanding in different communities. The genetic variation makes the effects of these bacteria different and unpredictable in different human societies. Therefore, the safety control and evaluation of their non-pathogenicity is of great importance and monitoring centers are required to closely monitor the safety of the bacteria used in food products. In this study, two strains of *Lactobacillus* isolated from dairy products of Ardabil (Heyran mountain road villages) and Khuzestan province (Behbahan city) in Iran were identified based on the biochemical and molecular properties through sequence analysis of 16S rRNA gene. Then, their safety was examined based on the international guidelines, especially the European Union standard. The two identified strains included *Lactobacillus fermentum* (PTCC 1929) and *Lactobacillus helveticus* (PTCC 1930). The results showed the lack of gelatinase enzyme, inability of blood hemolysis, inability of amino acids decarboxylation and the lack of genes responsible for the invasive characteristics of pathogenic microorganisms including *gelE*, *efaA_{fm}*, *efaA_{fs}*, *agg*, *ace*, *cylM*, *cylA*, *cylB*. In addition, the results showed the sensitivity of both isolates to Penicillin, Ampicillin, Rifampicin and Tetracycline, and their resistance to Kanamycin and Ciprofloxacin. *Lactobacillus fermentum* was resistant to vancomycin, whereas *Lactobacillus helveticus* was susceptible to it. Since cases of antibiotic resistance are inherent according to scientific reports, the obtained results confirmed the potential application of these two isolated strains as starter in the fermented dairy products. It also confirmed the necessity of using safety assessment procedures for probiotic bacteria.

Key Words: Risk Assessment, Lactic Acid Bacteria, Probiotic, Starter culture

* Corresponding Author E-Mail Address: mirdamadi@irost.ir