Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

ارزیابی ایمنی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران

فاطمه باقری[1]، سعید میردامادی[2*]، مهتا میرزایی[3]، سید ملیحه صفوی[4]

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 درحال گسترش است. تنوع ژنتیکی باعث می‌شود اثرات این باکتری‌ها در جوامع مختلف انسانی، متفاوت وغیر 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 بیوشیمایی ومولکولی 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 تهاجمی میکروارگانیسم‌ها شامل *cylB* و *gelE efaA$_{fm}$, efaA$_{fs}$, agg, ace, cylM, cylA* را در باکتری‌های مورد بررسی نشان داد. علاوه برآن نتایج نشان دادند هر دو جدایه نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، تتراسیکلین، آمپی_سیلین و ریفامپین حساس و نسبت به کانامایسین و سیپروفلوکساسین دارای مقاومت هستد. *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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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 درصورت 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 کاملا مشخص باشند[6]. بعبارت علمی‌تر سویه‌ها باید تحت عنوان "بطور کلی ایمن" یا "GRAS[1]" طبقه بندی گردند[6-8]. بطورکلی، 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 پروبیوتیک ها از جمله ***L.casei***)، عفونت خون، عفونت ادراری، برخی عفونت‌های روده‌ای و آبسه در بیماران تحت درمان با دارو، افراد دارای ضعف ایمنی و نوزادن 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 سویه-های *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 ونوشیدنی‌های تخمیری هستند[14]. با وجود آنکه بسیاری از آنها جزء باکتری‌های ایمن (GRAS) طبقه‌بندی می‌شوند اما گزارشاتی نیز در خصوص ایجاد بیماری‌های زمینه‌ای و عفونتی 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 وفراسودمند طراحی شده است.

2- مواد وروش‌ها

2-1 مواد

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

1. Generally Regarded As Safe

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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 درفریزر80- درجه سانتی‌گراد در محیط شیر بدون چربی حاوی 15% گلیسرول نگهداری و بر اساس خواص بیوشیمیایی شامل تولید آنزیم کاتالاز و تخمیر قندها [16] وخواص مولکولی شامل آنالیز توالی 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفتند [17, 18].

3-2-استخراج DNA ژنومی

ابتدا سویه‌های لاکتوباسیلوس برروی محیط MRS[2] آگار در 37°C کشت داده شدند، سپسDNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA (یکتا تجهیز آزما، تهران، ایران) استخراج شد. نمونه DNA در C° 20- نگهداری شده و برای واکنش PCR مورد

استفاده قرار گرفت مخلوط واکنش PCR در حجم 20 میکرولیتر حاوی 50 نانوگرم DNA ژنومی استخراج شده، 1میکرولیتر پرایمر (20میکرومولار)، 1میکرولیتر dNTP (5 میلی‌مولار)، 1میکرولیتر کلرید منیزیم (1/5 میلی مولار) و 0/1 U آنزیمTaq DNA پلیمراز 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، جریانV 90-80، 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 16rRNAباکتری

محصولات حاصل از تخلیص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای رفت و برگشت زیر و با روش اتومات سنجر بر اساس روش دی‌دئوکسی‌نوکلئوتیدهای 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 Projectمقایسه 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 قرارگرفت.

1-5-2-آزمون‌های فنوتیپی

1-1-5-2- فعالیت همولیتیک

توانایی تولید همولیزین، توسط کشت سویه‌های باکتریایی در محیط کشت حاوی 5% خون گوسفند (بلاد آگار) و گرمخانه‌گذاری در دمای37°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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

شدند [19, 20].

2-1-5-2- آزمون ژلاتیناز

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

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

ارزیابی فعالیت دکربوکسیلاز در باکتری‌ها براساس روشBover-Cid و Holzapfel انجام شد. جهت القاءآنزیم، ابتدا سویه‌ها در محیطهای کشت MRS حاوی 0/1% از هر کدام از اسیدآمینه های هیستیدین، لیزین، تیروزین و اورنیتین کشت داده شدند. سپس به محیط کشت حاوی اسیدآمینه مورد نظر و بروموکروزول (به عنوان اندیکاتور pH) انتقال و برای مدت 4 روز در شرایط هوازی و در دمای37°C گرمخانه‌گذاری شدند. محیط کشت فاقد اسیدآمینه به عنوان نمونه کنترل منفی در نظر گرفته شد. حضور هاله بنفش اطراف کلونی‌ها، نشان دهنده فعالیت دکربوکسیلازی مثبت می‌باشد. در مورد محیط حاوی اسید آمینه تیروزین، محو شدن هاله رسوبی در اطراف کلونی‌ها به عنوان پاسخ مثبت در نظر گرفته شد[21].

2-6- تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک (آنتی‌بیوگرام)

میزان حساسیت و مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک توسط دیسک‌های حاوی آنتی بیوتیک (پادتن طب) شامل آمپی‌سیلین (10 میکروگرم)، کانامایسین (30 میکروگرم)، سیپروفلوکسازین (5 میکروگرم)، جنتامایسین (10میکروگرم)، پنی‌سیلین (10 میکروگرم)، ریفامپین(5 میکروگرم)، تتراسایکلین(30 میکروگرم) و ونکومایسین (30 میکروگرم) با استفاده از تست آنتی‌بیوگرام بررسی شد. برای این منظور دیسک‌های آنتی‌بیوتیک بر روی محیط کشت MRS آگار، حاوی سویه‌های مورد نظرقرار داده شدند. پس از 24 ساعت گرمخانه‌گذاری دردمای37 °C، قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد[22].

2-7-آزمون ژنوتیپی

2-7-1-حضور ژن‌های بیماری‌زا

به منظور بررسی حضور ژن‌های موثر در تهاجم میکروارگانیسم-های بیماریزا، DNA ژنومی بدست آمده از دو سویه برای حضور ژن‌های بیماری‌زای *gelE* ، $efaA_{fm}$، $efaA_{fs}$، *agg*، *ace*، *cylM*، *cylA* و *cylB* بررسی شد. فهرست پرایمرهای استفاده شده در این ارزیابی، در جدول3 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 پلیمراز بود. برنامه PCR مطابق برنامه ارائه شده در جدول1 در 35 سیکل اجراشد. 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. *انتروکوکوس فکالیس*(PTCC1778) تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران *وانتروکوکوس فاشیوم* SM09 به عنوان سویه‌های کنترل مثبت برای بررسی بیان ژن‌های بیماری‌زا، در نظر گرفته شدند [19].

Table 2 PCR program for identifying pathogen genes

Step	Temperature (°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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

Table 3 Primers specification to identify pathogen genes

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

3-نتایج

3-1-شناسایی سویه

شناسایی ملکولی، یکی از اساسی‌ترین بخش‌ها در بررسی ایمنی سویه های 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 ژن16S rRNA بعنوان *دو سویه لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (PTCC1929) و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس*(PTCC1930) شناسایی شدند. بطوریکه به ترتیب دارای مشابهت 100% با توالی ژنومی سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* CIP102980(T) و سویه لاکتوباسیلوس هلوتیکوس DSM20075 (T) ثبت شده با کدهای JN175331 و IACLM1000202 در پایگاه NCBI بودند.

3-2-ارزیابی ایمنی باکتری‌ها با روش‌های فنوتیپی

بررسی فعالیت همولیتیک، تجزیه ژلاتین و توانایی دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه‌ی تیروزین، اورنیتین، لیزین و هیستیدین و مقاومت به آنتی‌بیوتیک،از جمله تست‌های فنوتیپی 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.

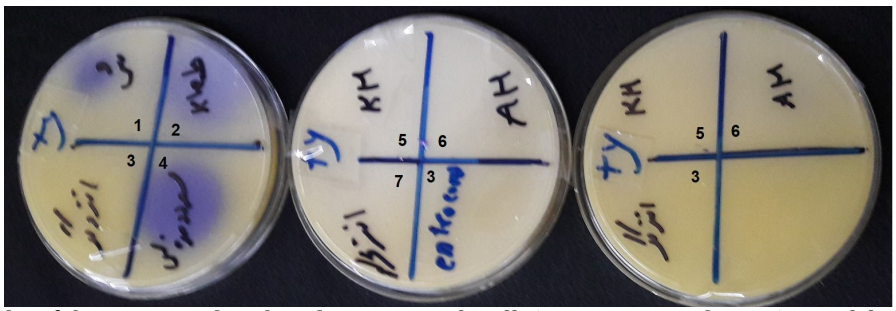

Fig 1 The results of the Tyrosine decarboxylase test: *1- shigella*(positive control strain) ,2- *Klebsiella* (positivec ontrol strain), *3- Enterococcus(* negative control strain) , *4-Pseudomonas aeruginosa* (positive control strain), 5- *L. helveticus*, 6- *L. fermentum*, 7- *Enterobacter* (negative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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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* (ATCC29212)بعنوان نمونه کنترل مثبت، تایید کننده درستی نتایج بود. در تست ژلاتینازحفظ 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. درحالیکه در نمونه های کنترل حاوی باکتری‌های *باسیلوس*، *سودوموناس ائروژنوزا*، *سراشیا مارسسنس*، *استافیلوکوکوس ارئوس* بعنوان نمونه های 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 اورنتین و همچنین عدم محو شدن هاله رسوبی در اطراف کلنی های رشد کرده در محیط حاوی تیروزین، تایید کننده منفی بودن فعالیت 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 پاراپلانتاروم* (SM01) به عنوان نمونه_های کنترل منفی در نظر گرفته شدند.

3-3-ارزیابی مقاومت باکتری‌ها به آنتی بیوتیک

مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های تتراسکلین، ریفامپین ،گروه بتالاکتامی شامل پنی‌سیلین،آمپی‌سیلین، 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 وسویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (PTCC 1929) علاوه بر دو آنتی‌بیوتیک فوق، نسبت به ونکومایسین نیز مقاومت نشان داد. هر دو سویه نسبت به سایر آنتی بیوتیک‌ها حساس بودند.

Table 3 Antibiogram test results

Antibiotic / Bacteria	P	TET	VAN	K	CP	GM	AM	RIF
Lactobacillus fermentum	43.5mm	26.5mm	0	0	0	11mm	38.5mm	29mm
Lactobacillus. helveticus	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

4-3-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 دهنده سلول [3] 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. همانطورکه نتایج نشان می‌دهند ژنوم دو سویه باکتری مورد بررسی فاقد ژن-های بیماری‌زای مورد مطالعه بودند.

3. Aggregation proteins

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

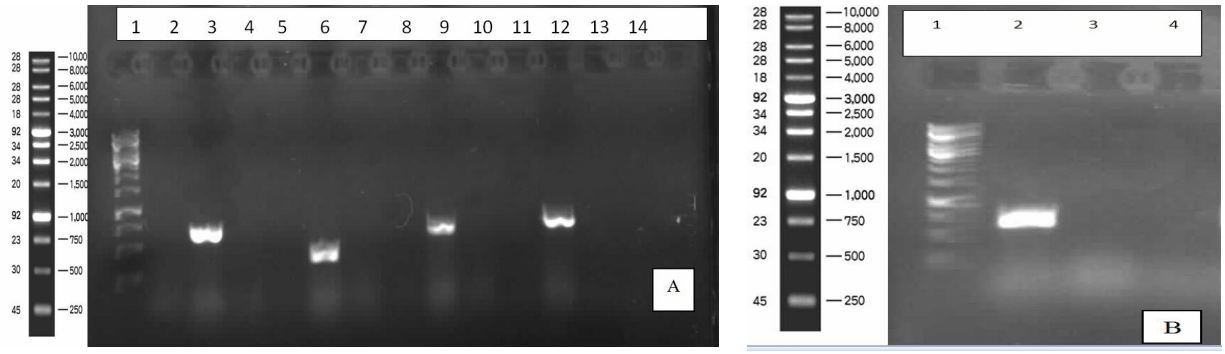

Fig 2 (A). PCR gel electrophoresis image for *efaa $_{fs}$, gelE, cylM and cylB* genes. Lane 1: The molecular weight marker (DNA ladder 1kb), lane 2: negative control, lane 3: *E. faecalis* PTCC1778 positive control strain for *efaa $_{fs}$* gene, lane 4: *Lactobacillus fermentum* strain, lane 5: *Lactobacillus 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

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* 25-0 و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم A* 18- 12 جدا شده از خمیر ارزن در غرب افریقا مثبت و فعالیت بتا همولیتیک آنها منفی گزارش شد[26]. آدی‌مپونگ وهمکاران (2012.) نیز مثبت بودن فعالیت آلفا همولتیک 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 همولتیک 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 گلبول قرمز می باشد. و تولید سیتولیزین نقش اساسی در شدت بیماری اندوکاردیت و اندوفتالمیت در مدل‌های حیوانی و بیماری‌های انتروکوکی در انسان دارد. اپرون سیتولیزین متشکل از ژن‌های $cylL_L$، *cylB*، $cylL_S$، *cylA* و *cylM* است که در بین آنها ژن‌های $cylL_L$ و $cylL_S$ 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

4. ATP-binding cassette transporter

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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

علاوه بر آن توانایی تولید آنزیم ژلاتیناز در سویه‌های باکتریایی به عنوان شاخص دیگر در ارزیابی ایمنی، مورد سنجش قرار گرفت. ژلاتیناز جزء گروه آنزیم های متالوآندوپپتیداز خارج سلولی یا متالوپروتئینازها تقسیم‌بندی می‌شود. این گروه از آنزیم‌ها قادر به هضم ژلاتین و ترکیباتی مانند فرومون، کلاژن، کازئین و فیبرینوژن می‌باشند. آنزیم ژلاتیناز تولید شده توسط میکرو ارگانیسمها، ژلاتین را به ترکیبات ساده‌تر نظیر پلی‌پپتید، پپتید و آمینواسید هیدرولیز می‌کند که این ترکیبات می‌توانند از غشای سلولی عبور کرده و توسط میکروارگانیسم‌ها مورد استفاده قرار گیرند. از طرفی فعالیت ژلاتیناز توسط باکتری‌ها در روده منجر به از هم پاشیدن لایه مخاطی روده و بر هم‌زدن نظم موجود و آغاز مسیرهای عفونت‌زایی می‌شود. حضور ژلاتیناز در چندین باکتری از جمله *سودوموناس آئروژنوزا*، *استافیلوکوکوس ارئوس*، *کلستریدیوم پرفرنژنجنس* و *سراشیا مارسسنس* گزارش شده است. عدم وجودفعالیت ژلاتیناز توسط باکتری‌ها، یکی ازمعیارهای غیر تهاجمی شناخته شدن سویه مورد نظر می‌باشد[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 سویه‌های مورد مطالعه، بررسی گردید و نتایج حاکی از عدم وجود ژن های مذکور بود. در مطالعات دیگری نیز این ویژگی در سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک به صورت فنوتیپی و ژنوتیپی ارزیابی شده است[7, 30, 31]. بررسی همزمان فنوتیپ و ژنوتیپ یک صفت، این اطمینان را بوجود می‌آورد که عدم تولید آنزیم توسط باکتری مورد نظر، نتیجه خاموش شدن ژن به دلیل عوامل مختلف نظیر موتاسیون نمی‌باشد 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 نظر در توالی ژنومی به صورت خاموش می باشد[7]. وجود ژن آنزیم ژلاتیناز و عدم فعالیت آنزیم ژلاتیناز در شرایط آزمایشگاهی در *و ویسلا* ویریسدسنس[32] و وجود *همزمان ژن و فعالیت ژلاتینازی در مورداانتروکوکوس فاشیوم و لوکونوستوک لاکتیس و انتروکوکوس فاشیوم گزارش* گردید [7].

فعالیت آنزیم‌های دکربوکسیلاز تولید شده توسط باکتری‌های لاکتیکی می‌تواند منجر به تولید آمین‌های بیوژنیک در مجصولات تخمیری حاوی پروتئین شود. حضورآمین‌های بیوژنیک در غذاهای تخمیری مانند پنیر، شراب، آب جو، سوسیس وماهی در بالاترین سطح به میزان 1000-100 میلی گرم دریک کیلوگرم پیامدهای بهداشتی ناخواسته_ای نظیر میگرن، زخم معده و روده و یا پاسخ‌های آلرژیک برای مصرف کننده در پی‌خواهد داشت. از اینرو وجود آنها می‌تواند به عنوان شاخص آلودگی میکروبی غذا در نظر گرفته شود[33]. .بنابراین لازم است سویه‌های باکتریایی‌جدید قبل از استفاده در فرمولاسیون غذایی از نظر توانایی تولید آنزیم‌های دکربوکسیلاز مورد ارزیابی قرار گیرند[34]. از این رو در این تحقیق، امکان تولید آمین‌های بیوژنیک هیستامین، تیرآمین، کاداورین وپوترسین توسط سویه‌های باکتری مورد نظر، به ترتیب از اسید آمینه‌های هیستیدین، تیروزین، لیزین و اورنیتین موجود در محیط کشت بررسی شد و نتایج حاصله بیانگر عدم توانایی باکتری‌ها در تولید آمین‌های بیوژنیک مذکور بود. در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است که *لاکتوباسیلوس پنتوسوس*(22C) جدا شده از ماست سنتی ایرانی[5]، سویه *لاکتوباسیلوس فاشیوم**KH2* جدا شده از خامه[4] فاقد آنزیم های دکربوکسیلاسیون بوده اند. پرادان وهمکاران (2019) نیزسویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* MTCC 5690 و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* MTCC را فاقد فعالیت دکربوکسیلازی و دکربوکسیلاسیون آمینواسیدهای تیروزین، هیستیدین ،لیزین،یا اورنیتین گزارش کردند. در حالیکه سلیمانزاده وهمکاران (2017)، از بین 12سویه‌های جدا شده از چال(شیر شتر تخمیری سنتی ایران)شامل *لاکتوباسیل‌ها*، *انتروکوکوس ها*، *لوکونوستوکه* 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 سویه‌های

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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 ژن های اتصال به رسپتورهای سلولی در پروبیوتیک‌ها از ویژگی های مثبت تلقی می گردد اما وجود ژن_های عامل اتصال به کلاژن و فاکتورهای اتصال سلول‌ها به یکدیگر (cell aggregation) از ویژگی‌های میکروارگانیسم های پاتوژن می‌باشند. لذا بررسی ویژگی‌های فوق اهمیت بالایی در ارزیابی خواص تهاجمی باکتری‌ها به بافت دارند. ژن های[5] $efaA_{fs}$ و $efaA_{fm}$ از مهمترین ژن‌های تهاجمی و مسئول چسبندگی دیواره سلولی در *انتروکوکوس‌ها* به شمار می‌روند. نقش بیماری‌زایی ژن $efaA_{fs}$ درمدل‌های 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 فرمنتوم* (PTCC 1929) و *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (PTCC1930) بود. در حالیکه سلیمان زاده وهمکاران (2017) وجود حداقل یکی از ژن‌های $efaA_{fs}$، $efaA_{fm}$، ***ace*** را دربرخی 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 *انتروکک‌ها* و *لاکتوباسیل‌ها* وجود دارد[39, 40]. اما پابا ومانا (در سال 2003) گزارش نمودند که از 40 سویه انتروکک جدا شده از محصولات لبنی، هیچ کدام از جدایه‌ها حاوی این ژن نبودند زومیتی همکاران (2018) در تحقیق صورت گرفته بر روی *انتروکک فاشیوم* جدا شده از نوعی گوشت تخمیری گزارش کردند بجز یک جدایه (*انتروکک فاشیوم*MZF1)، سایر سوش‌ها فاقدژن ***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 می باشد[24]. وجود ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها در صورتی که دارای فاکتورهای ژنتیکی قابل انتقال نظیر پلاسمید و ترانسپوزون باشند، از اهمیت خاصی برخودارند زیرا این باکتری‌ها می‌توانند، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک را به باکتری‌های بیماری‌زای دیگر موجود در دستگاه گوارش انتقال داده وباعث مشکل در درمان آنتی بیوتیکی گردند[1]. بنابراین دو سویه باکتری، از نظر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مورد بررسی در این تحقیق، نسبت به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتامی مهارکننده سنتزدیواره سلولی شامل پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی جنتامایسین، تتراسایکلین و ریفامپین‌حساس بوده‌اند[22]. گزارشات زیادی نیز حساسیت و مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک را به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آمپی‌سیلین و جنتامایسین وخانواده 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 فرمنتوم* (PTCC 1930) علاوه بر دو آنتی‌بیوتیک فوق، نسبت به ونکومایسین نیز مقاوم بود. .

کانامایسین جزء آمینوگلیکوزیدها است وطیف اثر آن بروی باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی از طریق مهار سنتز پروتئین می باشد[1].کانامایسین با تداخل در پروتئین‌سازی از طریق اتصال به زیر واحد 30S ریبوزوم باکتری مانع از رشد وتکثیر باکتری می‌گردد. سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک *لاکتوباسیلوس وانتروکک*، 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

5. Cell wall adhesion genes

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

سایر سوش‌های باکتریایی وجود ندارد[25] [41]. سیپروفلوکساسین جزء فلوروکینولون‌ها طبقه‌بندی می‌شود و بر باکتری‌های گرم مثبت وگرم منفی موثر می باشد[1]. سلیمانزاده وهمکاران (2017) نیز مقاومت سویه‌های *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 سویه‌های باکتری‌های لاکتیکی مورد استفاده برای تولید سوسیس‌های تخمیر شده، سویه‌های پروبیوتیک واستارترهای ماست و پنیرنشان داد که مقاومت به سیپروفلوکسازین به صورت ذاتی و به دلیل جهش در ژن‌های *gyrA* و*parC* (مسئول سنتز یکی از زیرواحدهای DNA جیراز و سنتز یکی از زیر واحدهای توپوایزومراز IV) بروز می‌کند[14]. در مطالعه شارما وهمکاران حساسیت آنتی بیوتیکی 30 جدایه شناسایی شده از 19 محصول تجاری ازجمله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی، اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس رامنوسوس لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مورد ارزیابی قرار گرفته است. اکثر جدایه‌ها به چندین آنتی بیوتیک، از جمله ونکومایسین،کانامایسین، مقاومت کمتر و در برابر توبرامایسین، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، متی‌سیلین، پنی‌سیلین، تتراسیکلین، آزیترومایسین،کلرامفنیکل ونووبیوسین مقاومت بیشتری را نشان داده‌اند[22]. همانطورکه در مورد کانامایسین اشاره شد، در صورت ذاتی بودن مقاومت باکتری های لاکتیکی به آنتی‌بیوتیک‌ها، آنطورکه در مورد اکثر باکتری های لاکتیکی گزارش شده است، این خاصیت یک ویژگی منفی از نظر تخریب جمعیت نرمال روده‌ای در بیماران مصرف کننده آنتی بیوتیک محسوب نمی‌شود [22, 43]. ونکومایسین نیز جزء گلیکوپپتیدها است و طیف اثر آن بروی باکتری‌های گرم مثبت ومنفی بخصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق مهار سنتز دیواره می‌باشد[1]. مقاومت ذاتی به ونکومایسین در باکتری‌های اسید لاکتیک در پژوهش‌های متعددی گزارش شده است [22, 25]. مقاومت به گلیکوپپتیدها(ونکومایسین) را می‌توان 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 می‌باشد[22]. مطالعه گای‌موندن (2013) نشان داد تغییر ساختاری مانع اتصال ونکومایسین و در نتیجه مقاومت به آنتی‌بیوتیک می_ شود[46]. با این حال گزارشاتی نیز در خصوص حساسیت برخی از باکتری-های اسید لاکتیک نظیر*لاکتوباسیلوس پنتوسوس* 22C جدا شده از ماست سنتی نسبت به ونکومایسین وجود دارد[5]. با توجه به گزارشات متعدد مبنی بر ذاتی بودن این مقاومت در باکتری های لاکتیکی، این احتمال مطرح می‌گردد که در مورد باکتری‌های مورد تحقیق نیز این ویژگی ذاتی بوده و در اینصورت نگرانی از انتقال ژن به سایر سوش‌های باکتریایی منتفی خواهد بود.

4- نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر علاوه بر تاکید بر اهمیت ارزیابی کامل خطر در سویه‌های انتخابی بعنوان کشت آغازگر و پروبیوتیک، نشان داد دو سویه باکتریایی جداسازی از محصولات لبنی بومی ایران با پتانسیل سلامت‌بخشی فاقد قدرت بیماری‌زایی از طریق ویژگی‌های مورد بررسی در این تحقیق هستند. با توجه به اثرات سلامت‌بخشی این باکتری‌ها که در تحقیقات قبلی ما به آنها پرداخته‌شده‌است، به نظر می‌رسد باکتری‌های فوق دارای پتانسیل استفاده به عنوان استارتر و یا احتمالا باکتری‌های پروبیوتیک در تولید محصولات لبنی سلامت‌بخش 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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

bacteria. Appl Environ Microbiol. 73(3): 730-9.

[15] Bagheri, F., Mirdamadi, S., Mirzaei, M., Safavi, M., 2019, Production of functonal 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 Enterococcusvirulence 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. l. Á. 2014. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated Lactobacillus kefiri. 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 Microbiolgy. 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., Snydman, 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., Hörmannsperger, 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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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. 20 .‥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 iof 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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 10:25 IRST on Tuesday January 26th 2021

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