

# تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی جدایه های اسید لاکتیک پنیروستی تالشی تولید شده از شیر خام

سید حدیثه موسوی<sup>1</sup>، تیوا کفیلی<sup>2\*</sup>

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

2- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد بویین زهرا، دانشگاه آزاد اسلامی، بویین زهرا، ایران

تاریخ پذیرش: 96/08/04

تاریخ دریافت: 95/08/08

## چکیده

در این پژوهش مقاومت آنتی بیوتیکی 26 ژنوتیپ از باکتری های اسیدلاکتیک شناسایی و جدا شده از یک نوع پنیر سنتی بنام پنیر تالشی بررسی و تعیین گردید. آنتی بیوتیک های مورد بررسی شامل پنی سیلین، ریفاپسین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین و نئومایسین بود. نتایج حاصله نشان داد، اکثر سویه ها به آنتی بیوتیک آمپی سیلین و پنی سیلین در دامنه  $0/25 - 8 \mu\text{g/ml}$  حساس بودند. دامنه حساسیت لاکتوباسیلوس پاراپلاتاروم نسبت به پنی سیلین بالاتر بود ( $\mu\text{g/ml}$  64-16). میزان MIC آنتی بیوتیک های (جنتامایسین، کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین) در اکثر گونه های مختلف لاکتوباسیلوس در دامنه ( $2-32 \mu\text{g/ml}$ ) مشاهده شد. لاکتوباسیلوس پاراپلاتاروم و لاکتوباسیلوس ساکنی نسبت به تتراسایکلین و تمامی ژنوتیپ های پاراپلاتاروم و پاراکازئی نسبت به کلرامفنیکل مقاومت ذاتی نشان داده در حالی که تمامی سویه ها نسبت به اریترومایسین حساس تشخیص داده شدند. تمامی گونه های مورد آزمایش در غلظت های پایین ریفاپسین قادر به رشد نبودند. استرپتوکوکوس گالولیتییکوس، نسبت به کلیه آنتی بیوتیک ها بجز استرپتومایسین همچنین انتروکوکوس فکالیس/فیسوم به کلیه آنتی بیوتیک های مورد مطالعه حساس تشخیص داده شدند. نتایج بدست آمده از تفسیر داده ها با نرم افزار MVSP نیز، علاوه بر اثبات نوع فنوتیپی بالا، کارآیی این روش در تفکیک جنس ها و حتی گونه ها را نشان داد. بنابراین می تواند بعنوان یکی از روش های فنوتیپی در کنار سایر روش ها برای شناسایی سویه ها پیشنهاد گردد.

**واژه های کلیدی:** مقاومت به آنتی بیوتیک، باکتری اسیدلاکتیک، پنیر تالشی، MIC، دندرو گرم

\*مسئول مکاتبات: [tivkafil@alumni.ut.ac.ir](mailto:tivkafil@alumni.ut.ac.ir)

## 1- مقدمه

آنتی بیوتیک ها نقش مهمی در درمان بیماری های عفونی دارند، اما استفاده بیش از حد آنها منجر به شیوع و گسترده گی مقاومت آنتی بیوتیکی در جهان شده است. این مساله امروزه به یکی از مهمترین چالشهای بهداشتی و درمانی مطرح است (19، 1). زنجیره غذایی می تواند یکی از مهمترین مسیرهای انتقال مقاومت از باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک از حیوانات به انسان باشد (23). باکتریهای اسیدلاکتیک بطور کلی جزء مواد GRASS شناخته شده اند، و حتی به بسیاری از آنها خواص پروبیوتیکی و ضد باکتریایی نسبت داده می شود. اما انواع گونه های باکتری های اسیدلاکتیک موجود در غذای انسان، غذای دام، دستگاه گوارشی انسان و حیوانات می توانند به عنوان مخزنی از ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک عمل کنند، که قابلیت انتقال افقی به میکروارگانیسم های بیماری زا را دارند (24). محصولات لبنی و گوشتی تخمیری که قبل از مصرف فرآیند حرارتی را متحمل نمی شوند می توانند به عنوان یکی از مهمترین مسیرهای انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی از حیوان به انسان شناخته شوند (18). با اینکه مقاومت آنتی بیوتیکی تاکنون در مورد گونه های پاتوژن های انسانی کاملاً مطالعه شده و نتایج آن منتشر شده است، تا آنکه تیوبر و همکاران<sup>1</sup> (1999) پیشنهاد نمودند که قابلیت باکتری های غیربیماریزای<sup>2</sup> غذا در انتقال ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی به فلور میکروبی طبیعی انسان بررسی شود (24). بدلیل اینکه امروزه سعی بر این است این باکتریها بطور عمدی وارد رژیم غذایی ما شوند، بنابراین در جداسازی و انتخاب و بکارگیری باکتری ها در تولید مواد غذایی، باید بررسی شود آنها عاری از ژن های قابل انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی باشند. بر این اساس امروزه برای انتخاب سویه هایی از باکتری اسید لاکتیک مناسب برای کشت های آغازگر جدید و کشت های پروبیوتیک، مقاومت آنتی بیوتیکی به عنوان یک ویژگی منفی

در بررسی صفات تکنولوژیکی سویه ها مورد جستجو قرار می گیرد (26). مطالعات در این زمینه به تازگی آغاز شده است و در دهه اخیر محققان به تعیین خصوصیات مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری های اسیدلاکتیک پرداخته اند (4). برای این منظور<sup>3</sup> MIC یعنی میزان کمینه غلظت یک آنتی بیوتیک که موجب بازدارندگی رشد میکروارگانیسم، مطالعه می شود (21). با مقایسه میزان حداقل بازدارندگی آنتی بیوتیکی گونه های متفاوت باکتری های اسیدلاکتیک جدا سازی شده از محیطها و منشاءهای متفاوت امکان تفکیک میان سویه های مقاوم و حساس و تفکیک میان سویه های مقاوم ذاتی و مقاوم اکتسابی، فراهم می شود (5). پنیر تالشی یک پنیر سخت است که به طور سنتی و بدون افزودن آغازگر و با استفاده از مخلوطی از شیر گوسفند و بز در کوهستان های منطقه تالش گیلان تولید شده و از عطر و طعم و کیفیت بالایی برخوردار است. با توجه به روند رو به رشد مطالعه بر روی محصولات سنتی در سطح دنیا، به منظور حفظ آن ها به عنوان منابع با ارزش ذخایر ژنتیکی باکتری های اسیدلاکتیک و یا تولید صنعتی آن ها به منظور اطمینان از کیفیت بهداشتی، در این تحقیق بر روی سویه های جدا و شناسایی شده از پنیر تالشی آزمون های مقاومت آنتی بیوتیکی به عمل آمده تا ضمن بررسی آن ها از لحاظ دارا بودن ژنهای مقاومت آنتی بیوتیکی منتقل شونده و مخاطرات احتمالی برای سلامت مصرف کننده، در مطالعات بعدی و طراحی کشت آغازگر برای این پنیر حذف شوند.

## 2- مواد و روش ها

در این مطالعه میزان حداقل بازدارندگی، 26 سویه دارای ژنوتیپ متفاوت از میان 54 سویه و درمورد ده آنتی بیوتیک رایج در درمان بیماری ها تعیین و مورد بررسی واقع شد. سویه ها با استفاده از روش<sup>4</sup> RAPD-PCR و 16S rRNA شناسایی شده اند (1).

<sup>3</sup>Minimum Inhibitory Concentration<sup>4</sup>Random Amplified Polymorphic DNA<sup>1</sup>Teuber<sup>2</sup>Commensal

## 1-2- فعال سازی مجدد جدایه ها

کلنی های منفرد از محیط های کشت MRS و M17 (مرک، آلمان) انتخاب شده و بصورت خطی تا سه بار تجدید کشت شدند. سپس پس از شناسایی با روش  $16S rRNA$  به محیط های MRS براث و M17 براث حاوی 20% گلیسرول (مرک، آلمان) منتقل و تا زمان انجام آزمایشات در دمای  $30^{\circ}C$  -25- نگهداری شدند. جهت فعال سازی  $100\mu l$  از هر معلقه بر روی پلیت های MRS و M17 کشت سطحی شده و سپس یک کلنی انتخاب و بصورت خطی بر روی پلیت حاوی محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) کشت، و بترتیب در دمای  $30^{\circ}C$  و  $37^{\circ}C$  گرمخانه گذاری شدند.

## 2-2- روش رقیق سازی

رقت های مورد نیاز آنتی بیوتیک ها با توجه به غلظت اولیه مندرج توسط شرکت تولیدکننده و با توجه به رابطه زیر تهیه شدند.

$$P \times V \times C = W \times (1000/P)$$

P: میزان قدرت آنتی بیوتیک اعلام شده توسط شرکت سازنده

W: وزن آنتی بیوتیکی که در حجم V باید حل شود

V: حجم مورد نیاز

C: غلظت نهایی محلول

جهت تهیه محلول مادر هر آنتی بیوتیک با غلظت 50 mg/ml ابتدا 500 میلی گرم پودر آنتی بیوتیک وزن شده و در 10 میلی-لیتر آب مقطر حل شد. سپس 2 میلی لیتر از محلول با غلظت 50 mg/ml به 8 میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده تا غلظت 10000 mg/L حاصل شود. جهت بدست آوردن سایر غلظت-های مورد نیاز بصورت زیر عمل شد:

$1000\mu l$  از محلول با غلظت  $10.000\text{ mg/L} + 9\text{ ml}$  حلال:  
 $1000\text{ mg/L}$  و  $100\mu l$  از محلول با غلظت  $10000\text{ mg/L} + 9/9\text{ ml}$  حلال: برای محاسبه سایر محدوده غلظتی مورد نیاز ( $0/25-128\text{ mg/L}$ )، 11 لوله آزمایش استریل با اعداد 0/5، 1، 2، 4، 8، 16، 32، 64، 128 mg/L، 0/5، 0/25 و 0 نامگذاری شدند. از محلول ذخیره  $10000\text{ mg/L}$

6 و  $251\mu\text{m}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $128\text{ mg/L}$ ،  
 $128\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $64\text{ mg/L}$ ،  
 $64\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $32\text{ mg/L}$ ،  
 $32\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $16\text{ mg/L}$ ،  
از محلول ذخیره  $1000\text{ mg/L}$ ،  $160\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $8\text{ mg/L}$ ،  $80\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $4\text{ mg/L}$  و  $40\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $2\text{ mg/L}$ ، از محلول ذخیره  $100\text{ mg/L}$ ،  $200\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $1\text{ mg/L}$  و  $100\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $0/5\text{ mg/L}$  و  $50\mu\text{l}$  وارد لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $0/25\text{ mg/L}$ ، به لوله آزمایش برچسب گذاری شده  $0\text{ mg/L}$  هیچ آنتی بیوتیکی اضافه نگردید (22).

## 2-3- تهیه استاندارد نیم مک فارلند، معلقه میکروبی و نحوه کشت و خواندن نتایج

$0/5\text{ ml}$  از کلرور باریم ( $\text{BaCl}_2$ )  $0/048\text{ mol/l}$  ( $2\text{H}_2\text{O}$ )،  $99/5\text{ ml}$  اسیدسولفوریک  $1/175\text{W/V}$   $\text{BaCl}_2$  را به  $99/5\text{ ml}$  اسیدسولفوریک  $0/18\text{mol/L}$  ( $1\text{ V/V}$ ) اضافه کرده و سپس در لوله های  $4-6\text{ ml}$  هم اندازه با لوله های سوسپانسیون باکتریایی در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. قبل از استفاده نیز سوسپانسیون با استفاده از ورتکس، به کدورت یکنواخت رسانده می شد. جهت تهیه معلقه میکروبی نیز چند کلنی مجزا و مشابه، در سرم فیزیولوژی حل شده تا به غلظت برابر با مک فارلند برسد. با وجود روش دقیق تر اسپکتروفتومتری این روش چشمی بدلیل سرعت بالا و صحت کافی آن مورد استفاده قرار گرفت. به چاهک های طولی میکروپلیت،  $75\mu\text{l}$  از معلقه میکروارگانسیم (بجز چاهک آخر) و  $75\mu\text{l}$  از رقت های آنتی بیوتیک (بجز دو چاهک آخر) اضافه شد. جهت همگن کردن، 4 مرتبه پیپت می شد. میکرو پلیت با پارافیلیم پوشانده شده و لاکتوباسیل ها و لاکتوکوکسی ها بترتیب در  $30^{\circ}C$  و  $37^{\circ}C$  بمدت 24 ساعت نگهداری شدند. میکروپلیت ها با توجه به چاهک های کنترل منفی و مثبت خوانده شدند.

جدول 1. نحوه کشت در یک میکرو پلیت جهت تعیین حداقل بازدارندگی آنتی بیوتیکی

پنی سیلین	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A کشت جدایه 1	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
B (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C جدایه 2	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
D (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
E جدایه 3	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
F (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
G جدایه 4	0/25	0/5	1	2	4	8	16	32	64	128	+	-
H (کنترل)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

سطرهای A، B، C، E، G: جدایه های کشت شده در چاهک های محتوی غلظت های مختلف یک آنتی بیوتیک. سطرهای B، D، F، H: جدایه های کشت شده در چاهک های فاقد آنتی بیوتیک (معنوان کنترل). چاهک های 1 تا 10: حاوی رقت های 0/25 تا 128 یک آنتی بیوتیک مورد آزمایش. چاهک 11: کنترل مثبت، حاوی میکروارگانیسم و فاقد آنتی بیوتیک، جهت بررسی کافی بودن محیط کشت برای حمایت از رشد. چاهک 12: کنترل منفی، حاوی محیط کشت فاقد میکروارگانیسم، جهت بررسی استریلیزه بودن محیط کشت.

مورد آزمون رقیق سازی در چاهک قرار گرفتند. این باکتری ها برتریب لاکتوباسیلوس پلاتناروم (5 سویه، 2 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس پاراپلاتناروم (15 سویه، دارای 6 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس کرواتوس<sup>8</sup> (4 سویه، 2 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس ساکنی (3 سویه، 2 ژنوتیپ)، لاکتوباسیلوس پاراکازئی (11 سویه، 5 ژنوتیپ)، استرپتوکوکوس گالولیتیکوس<sup>9</sup> (9 سویه، 5 ژنوتیپ)، انتروکوکوس فکالیس/فیسوم (7 سویه، 4 ژنوتیپ)، بودند که جمعا 26 سویه دارای ژنوتیپ متفاوت انتخاب شده و مورد آزمون آنتی-بیوتیک های پنی سیلین، ریفامپسین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل، اریترومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کانامایسین،

#### 2-4- تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز آماری، ابتدا ماتریس صفر و یک داده ها تشکیل شد (ردیف ها: جدایه ها و ستون ها: میزان MIC). سپس با استفاده از نرم افزار MVSP<sup>5</sup> و الگوریتم تجزیه خوشه ای UPGMA<sup>6</sup>، دندروگرام مربوطه رسم و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

#### 3- بحث و نتایج

3-1- نتایج مربوط به تعیین میزان MIC با استفاده از روش رقیق سازی در چاهک<sup>7</sup>:  
54 سویه از باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده از پنیستی تالشی جهت بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی

<sup>5</sup>Multivariate statistical package

<sup>6</sup> Unweighted pair group

<sup>7</sup>Microdilution

<sup>8</sup>Lb. Curvatus

<sup>9</sup> St. Gallolyticus

ژنتیکی مبتنی بر جستجوی ژن مقاومت جهت اطمینان بایستی انجام شود. نتایج مقاومت لاکتوباسیلوس ها به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی موثر بر روی سنتز پروتئین (جنتامایسین، کانامایسین، نئومایسین و استرپتومایسین) نشان داد میزان حداقل بازدارندگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کرواتوس تا حدودی در میان گونه های مختلف لاکتوباسیلوس در محدوده یکنواخت تری قرار داشت ( $2-32 \mu\text{g/ml}$ ). بسیاری از داده ها نشان دهنده حساسیت سویه ها بود اما برخی سویه های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم نسبت به کانامایسین و استرپتومایسین مقاومت نشان دادند. یک ژنوتیپ از لاکتوباسیلوس کرواتوس نسبت به استرپتومایسین، هر دو ژنوتیپ لاکتوباسیلوس ساکنی و دو ژنوتیپ لاکتوباسیلوس پاراکازنی نسبت به کانامایسین و استرپتومایسین مقاومت نشان دادند. همچنین نتایج حاکی از بالاتر بودن میزان MIC استرپتومایسین ( $16-64 \mu\text{g/ml}$ ) نسبت به جنتامایسین ( $2-8 \mu\text{g/ml}$ ) در اکثر گونه ها بود. این نتایج با نتایج حاصل از تحقیقات دانلیسون و ویند (2003) و کورهونن (2008) مطابقت داشت (8، 16). همچنین دانلیسون و ویند (2003) در سویه ای از لاکتوباسیلوس کرواتوس جدا شده از پنیر تولید شده از شیر خام ژن های کدکننده آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزید مانند *aacA-aphD* را یافتند (8). مقاومت لاکتوباسیلوس ها نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی قبلا نیز بارها توسط محققان گزارش شده بود (13، 8، 7، 27). هایز و همکاران (2008)، 65 سویه لاکتوباسیلوس کازنی و پاراکازنی را با روش رقیق سازی در چاهک و محیط کشت مولر هیتون بررسی نمودند، این سویه ها نسبت به آمپی سیلین و کلیندامایسین حساسیت نشان داده اما در برابر استرپتومایسین و جنتامایسین مقاومت نشان دادند (12). این مقاومت قبلا نیز گزارش شده بود و بدلیل نبود سیستم سیتوکرومی انتقال الکترون است که دریافت آنتی بیوتیک را مختل می سازد (21). نتایج بدست آمده احتمال ذاتی بودن مقاومت را تقویت می کند. نتایج مربوط به بررسی مقاومت

استرپتومایسین، نئومایسین، پنی سیلین<sup>10</sup> (فارابی، ایران)، آمپی سیلین<sup>11</sup> (فارابی، ایران)، اریترومایسین<sup>12</sup> (فارابی، ایران)، جنتامایسین<sup>13</sup> (ابوریحان، ایران)، استرپتومایسین<sup>14</sup> (جابر ابن حیان، ایران)، نئومایسین<sup>15</sup> (داروپخش، ایران)، تراسایکلین<sup>16</sup> (حکیم، ایران)، کلرامفنیکل<sup>17</sup> (الحاوی، ایران)، ریفامپسین<sup>18</sup> (حکیم، ایران)، کانامایسین<sup>19</sup> (عرفان دارو، ایران) قرار گرفتند. در تعیین مقادیر بحرانی<sup>20</sup> نیز به <sup>21</sup>FEEDAP استناد شده است. در جداول 2 و 3، سویه هایی که مشکوک به مقاومت تشخیص داده شده اند با کادر رنگی نشان داده شده اند.

### 3-2- بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوباسیلوس ها

نتایج مربوطه در جدول 2 نشان داده شده است. چنانچه مشاهده می شود، نتایج نشان دادند که اکثر سویه های لاکتوباسیلوس به آنتی بیوتیک های آمپی سیلین ( $25-0/8 \mu\text{g/ml}$ ) و پنی سیلین حساس بوده اما در عین حال میزان حداقل غلظت بازدارندگی پنی سیلین برای لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم از سایر گونه ها بیشتر بوده و حتی از نقطه بحرانی تعیین شده، بالاتر گزارش شد. این نتایج با نتیجه تحقیق کلر و همکاران (2007) و کفیلی و همکاران (2010) مطابقت داشت (14، 13). اما بدلیل احتمال روی دادن جهش گونه های لاکتوباسیلوس پاراپلانتاروم در روش رقیق سازی در چاهک نمیتوان بر مقاوم بودن این سویه ها تاکید نمود و بررسی های

<sup>10</sup> Penicillin

<sup>11</sup> Ampicillin

<sup>12</sup> Erythromycin

<sup>13</sup> Gentamycin

<sup>14</sup> Streptomycin

<sup>15</sup> Neomycin

<sup>16</sup> Tetracyclin

<sup>17</sup> Chloramphenicol

<sup>18</sup> Rifampicin

<sup>19</sup> Kanamycin

<sup>20</sup> Break point

<sup>21</sup> Panel on Additives and products or substances used in Animal Feed

داده شدند. این نتایج قبلا نیز گزارش شده بود برای مثال، هایز و همکاران (2008) در سه سویه لاکتوباسیلوس پاراکازئی مقاومت اکتسابی به تتراسایکلین ( $MIC \geq 32 \text{ mg/ml}$ ), اریترومايسين ( $MIC \geq 16 \text{ mg/ml}$ ) کشف نموده و دلیل آن را اکتساب بترتیب ژنهای tet (M) یا tet (W) و ژن erm (B) اعلام کردند (12).

چندگونه لاکتوباسیلوس نسبت به آنتی بیوتیک‌های موثر بر روی سنتز پروتئین تتراسایکلین، کلرامفنیکل و اریترومايسين نشان داد لاکتوباسیلوس‌های پاراپلاتاروم و ساکئی نسبت به تتراسایکلین، همچنین تمامی ژنوتیپ‌های پاراپلاتاروم و پاراکازئی نسبت به کلرامفنیکل مقاومت نشان دادند درحالی- که تمامی سویه ها نسبت به اریترومايسين حساس تشخیص

نام سویه	Km	Rif	Cm	Tc	Nm	Sm	Gm	Em	Am	Pc
Lb.pp1	32	16	8	32	2	64	2	1	0/25	16
Lb.pp2	64	1	8	32	8	32	2	1	8	32
Lb.pp3	32	1	8	32	2	32	4	0/5	4	64
Lb.pp4	64	1	16	32	8	64	8	0/12	2	32
Lb.pp5	32	32	8	64	16	32	2	0/5	1	64
Lb.pp6	128	16	32	32	8	64	4	0/5	1	32
Lb.p1	16	0/5	4	2	4	16	4	1	0/25	1
Lb.p2	32	1	8	0/12	2	16	4	0/25	1	1
Lb.s1	128	0/5	1	16	16	16	8	0/12	2	2
Lb.s2	256	0/25	4	32	16	64	8	0/25	2	1
Lb.c1	16	0/25	0/25	2	4	32	4	0/12	0/5	0/25
Lb.c2	8	0/25	0/12	2	4	16	8	0/12	0/25	0/25
Lb.pc1	16	0/5	8	1	2	16	1	0/5	0/25	0/5
Lb.pc2	16	0/5	8	2	2	16	2	1	0/25	1
Lb.pc3	32	0/5	8	2	4	16	2	1	0/25	1
Lb.pc4	32	1	8	1	4	32	4	2	1	1
Lb.pc5	64	1	8	2	4	32	4	2	4	1

جدول 2. بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوباسیلوس ها **Lb**: لاکتوباسیلوس **pp**: پاراپلاتاروم **p**: پلاتاروم **c**: کرواتوس **pc**:

پاراکازئی

PC: پنی سیلین، Am: آمپی سیلین، Rif: ریفاپسین، Cm: کلرامفنیکل، Em: اریترومايسين، Tc: تتراسایکلین، Gm: جنتامایسین، Km: کانامایسین، St: استرپتومايسين، Nm: نتومايسين

استرپتوکوکوس بویس شناخته می شود، علاوه بر پنیر تالشی قبلا نیز در نمونه های لبنی جداسازی و شناسایی شده است. نتایج نشان داد میزان حداقل بازدارندگی برای کلیه آنتی-بیوتیک ها بجز استرپتومايسين در این جنس در حد حساس تشخیص داده شدند. این نتایج با برخی نتایج بدست آمده تطابق داشته اما برخی محققان مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی را برای تتراسایکلین، اریترومایسین و کانامایسین در سویه های جداسازی شده از نمونه های بیمارستانی گزارش نموده اند (11) (4). یکی از دلایل احتمالا تفاوت منشاء جداسازی این سویه-هاست. با توجه به این که تاکنون تحقیقی درمورد مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های این باکتری که از منشاء لبنی جداسازی شده باشند انجام نشده است، امکان مقایسه و نتیجه گیری دقیق-تر فراهم نیست.

ژن های مقاومت به تتراسایکلین مانند tet (M) نیز در بسیاری از گونه های لاکتوباسیلوس گزارش شده است (6، 3). مقاومت به این آنتی بیوتیک ها همچنین در استرپتوکوکوسی ها و انتروکوکوسی ها نیز دیده شده است که نشان دهنده اینست که هیچ مانع و سدی بین لاکتوباسیلوس ها و گونه های پاتوژن نیست (24) تمامی گونه های مورد آزمایش در غلظت های پایین ریفامپسین قادر به رشد نبودند. این نتایج قبلا نیز گزارش شده بود (14).

### 3-3- بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوکوکوسی-ها

نتایج مربوط به بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی لاکتوکوکوسی ها در جدول 3 نشان داده شده است. استرپتوکوکوس گوالیتیکوس که یکی از اعضای گروه

نام سویه	Km	Rif	Cm	Tc	Nm	Sm	Gm	Em	Am	Pc
St. g1	16	1	4	0/12	8	16	1	0/12	0/12	0/25
St. g2	16	2	2	0/12	8	16	2	0/25	0/12	0/25
St. g3	16	2	2	0/12	16	16	4	0/25	0/12	0/25
St. g4	16	2	2	0/5	16	8	4	0/5	0/5	0/25
St. g5	32	2	4	0/5	16	16	4	0/5	0/5	0/25
E. f1	8	8	4	1	2	4	1	1	0/25	8
E. f2	8	8	4	1	2	16	1	1	0/5	8
E. f3	8	8	4	1	4	32	4	4	1	4
E. f4	16	16	8	1	4	32	4	8	0/25	8

جدول 3. بررسی میزان مقاومت آنتی بیوتیکی استرپتوکوکوس گوالیتیکوس و انتروکوکوس های فکاليس/فيسوم

PC: پنی سیلین، Am: آمپی سیلین، Rif: ریفامپسین، Cm: کلرامفنیکل، Em: اریترومایسین، Tc: تتراسایکلین، Gm: جنتامایسین، Km: کانامایسین، St: استرپتومايسين، Nm: نئومايسين

کم نسبت به اتصال با پنی سیلین (PBP<sup>23</sup>) می باشد (9). با این حال این نتایج با نتایج موری و همکاران (1990) که میزان MIC سویه های انتروکوکوس فکالیس از نمونه های کلینیکی را از 4-8  $\mu\text{g/ml}$  و برای برخی سویه ها حتی مقادیر 0/5-4  $\mu\text{g/ml}$  گزارش کردند، مغایرت دارد (20). از دلایل این تفاوت، احتمالاً منشاء جداسازی متفاوت آنها (پنیر و نمونه های بیمارستانی) باشد. محققان گسترش مقاومت آمپی سیلین - پنی - سیلینی را در گونه های انتروکوکوی به تولید آنزیم بتالاکتاماز و یا تغییرات در ساختمان پروتئین PBP نسبت داده اند (9،24). این آنزیم در انتروکوکوس ها برخلاف استافیلوکوکوس اورئوس (که به این آنتی بیوتیک ها مقاوم است) بمیزان کمی تولید می شود که دلیل مقاومت نسبی برخی انتروکوکوس ها به این آنتی بیوتیک ها به این دلیل می باشد. همچنین سایر نتایج مربوط به مقاومت در برابر سایر آنتی بیوتیک ها نشان داد که میزان حداقل غلظت بازدارندگی برای آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی (جتنامایسین، کانامایسین، نئومایسین و اریترومایسین) پایین و کاملاً حساس تشخیص داده شد. این نتایج با نتیجه منتشر شده سایر محققین که آزمایشات مشابهی را بر روی سویه های جداسازی شده از نمونه های غذایی انجام داده بودند، مطابقت نشان داد. نادسون و هارتمن (1993) برسویه های جدا شده از گوشت خام، و فرانز و همکاران (2001) و تیوبر و همکاران (1999)، بترتیب با آزمایش بر سویه های جدا شده از شیر تخمیری و محصولات گوشتی مقاومت پایین آنتی بیوتیکی را در گونه های انتروکوکوس فکالیس/فیسوم گزارش نمودند (10،15،24). همگی سویه ها با 4 ژنوتیپ مختلف نسبت به ریفامپسین حساسیت نشان دادند اما با این حال اعلام شده است، با اینکه این آنتی بیوتیک در شرایط آزمایشگاهی کاملاً رشد انتروکوک ها را مهار می کند اما در شرایط بیولوژیکی این باکتری سرعت نسبت به این آنتی بیوتیک مقاومت کسب می کند (11،24). این مساله استفاده از این آنتی بیوتیک را در موارد درمانی بیماری های

باتوجه به اینکه برای درمان بیماری های احتمالی از عفونت ناشی از این میکروارگانیسم از ترکیب پنی سیلین و یک آنتی - بیوتیک آمینوگلیکوزیدی استفاده می گردد خوشبختانه تاکنون گزارشی از مقاومت پنی سیلینی این باکتری منتشر نشده است. مقاومت نسبتاً بالا نسبت به استرپتومایسین که در سویه های مورد مطالعه دیده شد، با روش رقیق سازی در چاهک قبلاً نیز گزارش شده بود اما پس از انجام آزمون های مبتنی بر PCR این مقاومت ناشی از جهش کروموزومی و نه مقاومت اکتسابی اعلام شد (17). انتروکوکوس های فکالیس/فیسوم که منشاء آنها دستگاه گوارش است، از مهمترین پاتوژن ها هستند. این جنس بعنوان باکتری اسیدلاکتیک از اهمیت کمتری برخوردار است. از آنجا که این جنس توسط محققان بسیاری در نمونه های پنیر گزارش شده است، نقش این باکتری بعنوان عامل مثبت در رساندن پنیر و تولید ترکیبات سودمند و حتی پری بیوتیک و یا یک عامل تهدید کننده سلامتی بدلیل تولید آمین های بیوژنیک هنوز مورد مناقشه محققان است (17). یکی دیگر از مهمترین دلایل نگرانی محققین نسبت به این میکروارگانیسم بدلیل مقاومت آن نسبت به بسیاری از آنتی بیوتیک های متداول مانند آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی، پنی سیلین و سایر آنتی بیوتیک ها است. یکی از موارد مطرح نمودن انتروکوکوس ها بعنوان پاتوژن ها اسحتصال مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمینوگلیکوزیدی، تراسایکلین، کلرامفنیکل، پنی سیلین و آمپی سیلین و نیز پتانسیل آنها برای مبادله اطلاعات ژنتیکی بوسیله مکانیسم الحاق<sup>22</sup> مطرح شده است (20). معمولاً در عفونت های انتروکوکوسی از آمپی سیلین استفاده می شود. چنانچه دیده می شود میزان MIC آمپی سیلین در سویه های جداسازی شده از پنیر سنتی تالشی در حد پایین و در محدوده (0/25-1  $\mu\text{g/ml}$ ) تعیین شده است. دلیل مقاومت پایین انتروکوک ها نسبت به آمپی سیلین، وجود پروتئین های با تمایل

<sup>23</sup>penicillin-binding protein<sup>22</sup>Conjugation



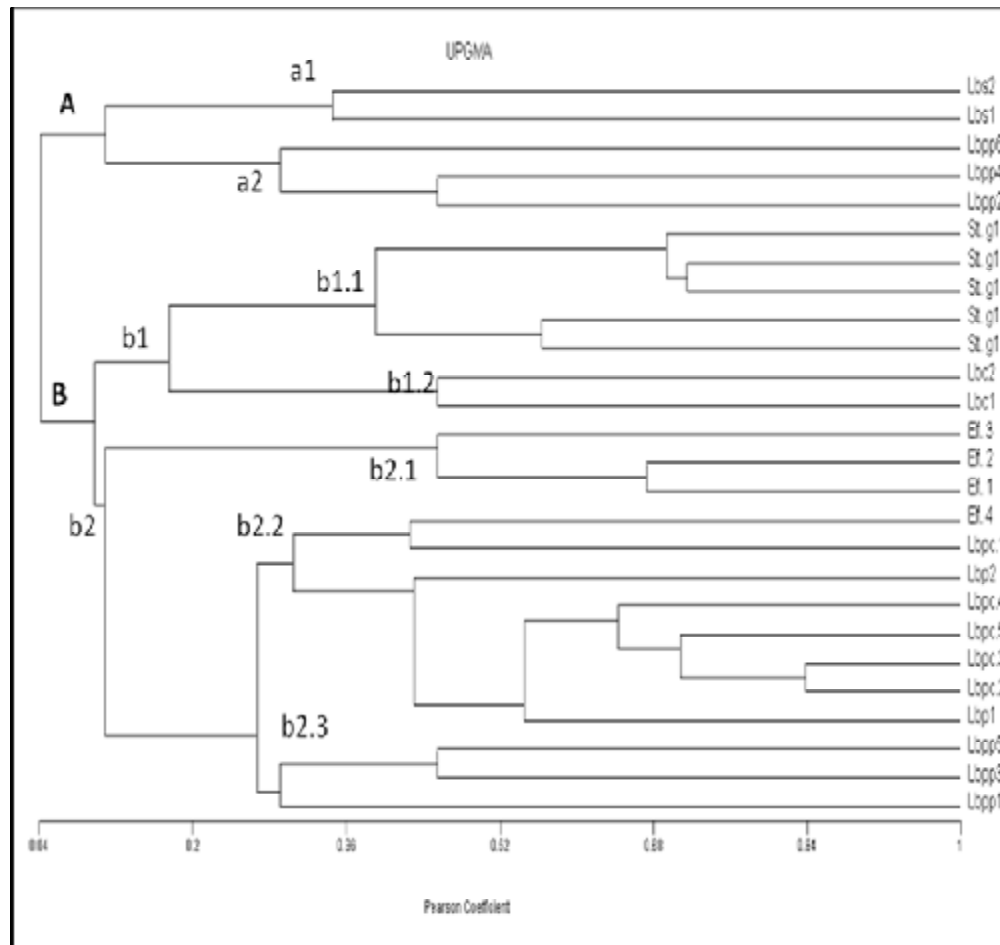
طیف متنوع تری شامل انتروکوکوس فکالیس، استرپتوکوکوس گالولیتیکوس و لاکتوباسیلوس های کرواتوس و پاراپلاتاروم گروه بندی شده اند. همچنین در این مطالعه برای اولین بار ایده استفاده از رسم دندروگرم بر اساس الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی جهت روشی برای تفکیک جنس ها و گونه های مختلف اسید لاکتیک مورد بررسی قرار داده شد. چنانچه دیده می شود، با استفاده از این روش، تا حدود زیادی می توان جنس ها و حتی برخی گونه ها را از یکدیگر تفکیک نمود. برای مثال جنس های استرپتوکوکوس گالولیتیکوس در زیر خوشه b1.1 و انتروکوکوس فکالیس در زیر خوشه b2.1 و گونه لاکتوباسیلوس ساکنی در زیر خوشه a1 تفکیک شده اند. اما این تکنیک قادر به تمایز همه گونه های لاکتوباسیلوس پاراپلاتاروم و پلاتاروم و پاراکازنی نبوده و بنابراین نیاز به سایر آزمایشات تکمیلی است. با اینحال عدم تفکیک پذیری این گونه ها بدلیل شباهت فنوتیپی و ژنتیکی بالا با تکنیک های فنوتیپی و حتی روش 16srRNA قبلا نیز گزارش شده بود (25).

ناشی از این باکتری با تردید مواجه می سازد. این نتایج این نظریه را که با وجود بودن برخی گونه های پاتوژن و فرصت طلب در جنس انتروکوکوس و با توجه به عدم تشخیص هیچگونه مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه های جداسازی شده از نمونه های غذایی، آنها می توانند بعنوان گونه های پروبیوتیک مطرح شوند را قوت می بخشد (2).

### 3-4- دندروگرم حاصل از داده های مربوط به مقاومت

#### آنتی بیوتیکی

آنالیز UPGMA الگوی فنوتیپی مربوط به سویه های انتخاب شده بعنوان نماینده هر ژنوتیپ با استفاده از ضریب پیرسون، منجر به تولید دندروگرم نشان داده شده در شکل 1 شده است. این دندروگرم، 26 ژنوتیپ حاصله را در 26 فنوتیپ متفاوت خوشه بندی کرده است که نشان دهنده تنوع فنوتیپی بالایی است. دو خوشه فنوتیپی اصلی (A و B) در این دندروگرم دیده می شود که هر کدام دارای زیر خوشه های a1 و a2 و (b1.1, b1.2) و (b2.1, b2.2, b2.3) هستند. در خوشه A لاکتوباسیلوس های ساکنی و پاراپلاتاروم و در خوشه B



شکل 1. دندروگرام رسم شده بر اساس آنالیز UPGMA و ضریب پیرسون، **Lbpc**: لاکتوباسیلوس پاراکاژی، **Lbp**: لاکتوباسیلوس پلانتروم، **Lbs**:

لاکتوباسیلوس ساکی، **Stg**: استرپتوکوکوس گوآلیتیوکوس، **Ef**: انتروکوکوس فکالیس، **Lbpc**: لاکتوباسیلوس پاراکاژی، **Lbp**: لاکتوباسیلوس پلانتروم، **Lbc**: لاکتوباسیلوس کرواتوس

شناختن و بعنوان پروبیوتیک مطرح کردن گونه‌های باکتری اسیدلاکتیک که تاکنون کاملاً بی‌خطر بنظر می‌رسیدند، از لحاظ عدم حمل ژن‌های قابل انتقال نیاز به مطالعات تکمیلی‌تر دارد. در این تحقیق همچنین با استفاده از داده‌های متنوع بدست آمده از تعیین میزان کمیته غلظت بازدارنده سویه‌های مختلف با روش رقیق سازی در چاهک و با رسم دندروگرام مربوط، قابلیت این روش در تفکیک جنس‌ها و گونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت که نتایج نشان از کارایی نسبتاً بالای این روش بعنوان روشی تاییدی در تفکیک و شناسایی باکتریهای اسیدلاکتیک داد.

#### 4- نتیجه گیری

بطور کلی می‌توان نتیجه گیری نمود که اغلب سویه‌های جداسازی شده که عمدتاً از جنس‌های لاکتوباسیلوس، انتروکوکوس و استرپتوکوکوس بوده دارای میزان حداقل بازدارندگی کمتر از نقطه شکست (بحرانی) بودند. با این حال در برخی سویه‌ها مقاومت آنتی‌بیوتیکی دیده شد که با توجه به نتایج و مطالعات محققان پیشین می‌توان آن را، مقاومت ذاتی و یا اکتسابی غیر قابل انتقال دانست. مقاومت لاکتوباسیلوس‌های پاراپلانتروم نسبت به پنی‌سیلین نیز، به احتمال روی دادن جهش در روش رقیق سازی با چاهک نسبت داده می‌شود. با وجود عدم تشخیص گونه‌های مقاوم در گزارش، سالم

assessment of lactic acid bacteria starter cultures and probiotics. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 96: 39-65.

11. Giraffa, G. 2002. Enterococci from foods. *EMS Microbiology Reviews*, 26(2): 163-171.

12. Huys, G., D'Haene, K., Danielsen, M., Mättö, J., Egervärn, M. and Vandamme, P. 2008. Phenotypic and molecular assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus paracasei* strains of food origin. *Journal of food protection*, 71 (2): 339-344.

13. Kafili, T. and Mayo, B. 2010. Antibiotic resistance-susceptibility profiles of *Lactobacillus* strains from Lighvan, a traditional Iranian raw milk cheese", *Milchwissenschaft*, 65(1): 59-62.

14. Klare, I., Konstabel, C., Mueller-Bertling, B., Kettlitz, C., Borgmann, S., Schulte, B., et al. 2005. Spread of ampicillin/vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic-virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *European journal clinical microbiology infection diseases*, 24: 815-825.

15. Knudtson, L.M. and Hartman, P. A. 1993. Antibiotic resistance among Enterococcal isolates from environmental and clinical sources. *Journal of Food Protection*, 56: 489-492.

16. Korhonen, J. M., Danielsen, M., Mayo, B., Egervärn, H., Axelsson, L., Huys, G., et al. 2008. Antimicrobial susceptibility and proposed microbiological cut-off values of lactobacilli by phenotypic determination. *International Journal of probiotics and prebiotics*, 3: 257-268.

17. Leclercq, R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infective Disease*, 15: 482-492.

18. Lukaova, J. and Sustackova, A. 2003. Review article. Enterococci and antibiotic resistance. *Acta veterinariabrnno*, 72: 315-323.

19. Mazel, D. and Davies, J. 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell molecular life science*, 56 (9): 742-54.

20. Murray, B. And Clewell, D. B. 1988. Plasmid and pheromone response of the betalactamase producer *Streptococcus* (*Enterococcus*) *faecalis* HH22. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32: 547-551.

## 5-منابع

1. همین نویسند. 1394. شناسایی سویه های باکتری اسید

لاکتیک پنیرستی تالشی با استفاده از روش های S و 16rRNA RAPD-PCR، دومین همایش ملی تازه های

سلولی مولکولی، واحدپرنده، تهران.

2. Abriouel, H., Omar, N.B., Molinos, A.C., López, R. L., Grande, M. J., Martínez-Viedma, P., et al. 2008. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 38-49.

3. Ammor, M.S., Belén Florez, A. and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24 (6): 559-570.

4. Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G. and Gardini, F. 2009. Antibiotic resistance of lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *Journal of food protection*, 72: 2162-2169.

5. Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of food protection*, 61: 1636-1643.

6. Chopra, I. and Roberts, M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology molecular biology review*, 65: 232-260.

7. Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Salzano, G. and Sorrentino, E. 2005. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *Le lait*, 85: 193-204.

8. Danielsen, M. and Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, 82: 1-11.

9. Fontana, R., Cerini, R., Longoni, P., Grossato, A. and Canepari, P. 1983. Identification of a streptococcal penicillin-binding protein that reacts very slowly with penicillin. *Journal of Bacteriology*, 155: 1343-50.

10. Franz, C. M., Hummel, A. and Holzapfel, W. H. 2005. Problems related to the safety

26. Von Wright, A. 2005. Regulating the safety of probiotics. The european approach current pharmaceutical design, 11: 17-23.
27. Zhou, J.S., Shu, Q., Rutherford, K.J., Prasad, J. and Gill, H.S. 2000. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lb. acidophilus* HN017, and *Bifidobacterium lactis* HN019 in BALB/c mice. International journal of food microbiology, 56 (1):87-96.
21. Piddock, L.J.V. 1990. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. Journal of applied bacteriology, 68: 307-318.
22. Shrestha, A. 2011. Antibiotic susceptibility and determination of MIC of potent antibiotics used against *Staphylococcus* spp. isolated from raw milk. Journal for young scientists, 21: 58-65.
23. Singer, R. S., Finch, R., Wegener, H. C., Walters, J. and Lipstich, M. 2003. Antibiotic resistance- The inter play between antibiotic use in animals and human beings. Lancet infectious diseases, 3:47-51.
24. Teueber, M., Meile L. and Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie van leeuwenhoek, 76: 115-137.
25. Torriani, S., Felis, G. E. and Dellaglio, F. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *Lb. pentosus*, and *Lb. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. Appl Environmental Microbiology, 67: 3450-3454.