

## بررسی بی‌ضرری انتروکوک‌های پروبیوتیکی بومی جدا شده

### از محصولات شیری و شیر انسان با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

- مهزاد خطیبی

کارشناس ارشد میکروبیولوژی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

- نرگس واسجی

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و کشاورزی، کرج

- بهزاد صالحی

عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

- ناهید مژگانی (نویسنده مسئول)

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکنس و سرمسازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۶۴۶۰۶۳

Email: dnmoj@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2017.114810.1498

#### چکیده

انتروکوکوس‌ها نقش مهمی در صنایع مختلف دارند. بعضی از انتروکوکوس‌ها نیز با منشاء لبنیات و شیر مادر به عنوان پروبیوتیک گزارش شده‌اند. هدف از این مطالعه، تعیین بی‌ضرری و ایمنی گونه‌های انتروکوک جدا شده از شیر بز، پنی‌ستی و نمونه‌های شیر مادر بود. نمونه‌های انتروکوکوس جدا شده به وسیله ویژگی‌های فنوتیپی و تعیین توالی 16srRNA تا سطح جنس شناسایی شدند و خواص پروبیوتیکی آن‌ها، زنده ماندن در شرایط اسیدی و حضور در درصد‌های مختلف نمک صفاوی در زمان‌های مختلف بررسی گردید. فعالیت ضد میکروبی این باکتری‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا و مقاومت آن‌ها نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز ارزیابی شد. جهت بررسی بی‌ضرری انتروکوک‌های شناسایی شده، حضور یا عدم حضور تعدادی از ژن‌های ویروالانس (*vanA*, *vanH*, *vanR*, *vanY*) با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی سنجیده شد. مقاومت فنوتیپی انتروکوک‌های انتخاب شده در برابر لیپاز، DNase و همولیز گلوبول‌های قرمز نیز تعیین گردید. نتایج این تحقیق خصوصیات پروبیوتیکی بعضی از این گونه‌ها را مشخص کرد. ۴ جدایه تحمل اسید و نمک صفر را نشان دادند و اثرات ضد میکروبی چشمگیری داشتند. تمامی سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیر مادر فاقد ژن‌های ویروالانس بودند. در آزمایشات فنوتیپی ویروالانس در سویه‌ها، همه سویه‌ها از نظر فعالیت همولیزی آلفاهمولیتیک بودند. همه سویه‌ها به تتراسایکلین، سفالوتین، آموکسی سیلین، سفازولین و داکسی سایکلین حساسیت نشان دادند و همه آن‌ها به جز سویه TA00154، نسبت به نالیدیکسیک اسید و تری متوپریم سولفامتاکسازول، مقاوم بودند.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، انتروکوکوس، ۱۶srRNA، ژن‌های ویروالانس، مقاومت و نکوماپسین

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 120 pp: 89-102

### Evaluating the Safety of Indigenous Enterococcus species isolated from dairy products and Breast milk by Biochemical and Molecular Methods

1:Mahzad Khatibi, MSc student Microbiology Department, Islamic Azad University, Karaj Branch-Iran

2:Narges Vaseji, Member of scientific board, Dept. Of Biotechnology, Animal Science Research

Institute of Iran (ASRI), Shahid Beheshti St.,Karaj, Iran.

3:Behzad Salehi, Member of scientific board, Islamic Azad University, Karaj Branch-Iran

4\*:Naheed Mojgani, Associate professor, Biotechnology Dept, Razi Vaccine and Serum Research Institute- Agriculture research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Received: July 2017

Accepted: December 2017

Enterococcus plays an important role in various industries. Some Enterococci isolated from dairy and breast milk has been reported as probiotics. However, these species selected as starter cultures or as probiotics should be evaluated for their safety and the absence of different virulence traits including virulence genes and antibiotic resistance. The aim of this study was to determine the safety of locally isolated Enterococcus species biochemically and targeting essential virulence genes by PCR method. A number of suspected Enterococcus species isolated from ewe milk, traditional cheese and mothers' milk were identified to genus level by phenotypic characteristics and 16SrRNA sequencing. The selected isolates were screened for their probiotic properties by determining their acid and bile resistance, antibacterial activity against a number of pathogens and antibiotic resistance. Phenotypic virulence parameters including lipase, DNase and hemolysis of red blood cells, was determined. The presence or absence of a number of virulence genes including *asa1*, *hyl*, *esp*, *agg*, *gelE*, *cylA*, *cylB*, *cylM*, *efaAfm*, *efaAfs* and vancomycin resistance genes including *vanA*, *vanH*, *vanR* and *vanY* was evaluated. The results of this study determined the probiotic properties of some of these species. Four isolates showed acid and bile salt tolerance and showed significant antimicrobial effects. All isolates from Breast milk, lacked virulence genes. In virulence phenotypic experiments, all strains were alpha hemolytic. All strains were susceptible to Tetracycline, Cephalothin Amoxicillin, Cefazolin and Doxycycline and all of them except the TA00154 strain, were resistant to Nalidixic acid and Trimethoprim sulfamethoxazole.

**Key words:** Probiotic, Enterococcus, 16S rRNA, Virulence genes, Vancomycin resistance

#### مقدمه

" برای حیات " منشاء گرفته و در تضاد با واژه آنتی بیوتیک به معنی ضد حیات می باشد. از طرفی دیگر، پروبیوتیک ها به عنوان میکروارگانسیم هایی که رشد میکروارگانسیم های دیگر را افزایش می دهند، نیز تعریف شده اند (Holzapfel و همکاران، ۲۰۰۱). در حال حاضر، نقش این باکتری ها در سلامت و عملکرد روده انسان و دام، عمدتاً به دلیل توانایی رشد در pH پایین و تولید عوامل ضد میکروبی به خوبی مورد تایید قرار گرفته است (Moreno و همکاران، ۲۰۰۶). به همین ترتیب، پتانسیل آنتی-

در چند دهه اخیر باکتری های اسید لاکتیک<sup>۱</sup> به دلیل عملکرد مهم خود در صنایع غذایی و توانایی تخمیر به خوبی شناخته شده اند. این باکتری های گرم مثبت نقش مهمی در اکوسیستم روده ایفا می کنند (Lin and Chan, ۲۰۰۰) و از جمله مهم ترین باکتری های پروبیوتیکی به حساب می آیند که با کلونیزه شدن در روده، مانع از رشد باکتری های مضر، به وسیله مکانسیم های حذف رقابتی، تولید اسیدهای آلی و ترکیبات ضد میکروبی می شوند. واژه پروبیوتیک از دو کلمه یونانی " پرو " و " بیوتیک " به معنی

<sup>1</sup> - Lactic Acid Bacteria(LAB)

بومی انتروکوکوس جدا شده از منابع مختلف (پنیر سنتی، شیر مادر و شیر بز) با آزمایشات بیوشیمیایی و مولکولی بود و خواص پروبیوتیکی آن‌ها مانند اثر ضد میکروبی، تحمل اسید و صفرا و ... مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری نمونه‌ها، محیط و شرایط رشد

در این مطالعه، از ۲۴ نمونه بومی انتروکوکوس که از شیر بز، پنیر سنتی و شیر مادر (با اجرای طرح‌های تحقیقاتی مختلف در سال‌های گذشته جداسازی شده بودند)، استفاده شد. جهت کشت و رشد باکتری‌های اسیدلاکتیکی از محیط MRS<sup>۲</sup> و از محیط BHI<sup>۳</sup> جهت کشت و رشد گونه‌های بیماری‌زا در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت تحت شرایط هوازی استفاده شد. برای نگهداری طولانی مدت این باکتری‌ها، کشت تازه در محیط مایع با ۱۵٪ گلیسرول در فریزر C ۲۰<sup>۰</sup>- قرار داده شد.

#### شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌ها

شناسایی بیوشیمیایی و ماکروسکوپی جدایه‌های به دست آمده با توجه به خصوصیات فنوتیپی شامل: مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و تست همولیز مورد بررسی قرار گرفت.

#### شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب

نمونه‌هایی که کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی بوده و الگوی تخمیر قند آن‌ها نزدیک به انتروکوکوس‌ها بود، با استفاده از تعیین توالی ناحیه 16S rRNA در حد جنس شناسایی شدند. استخراج DNA هر نمونه با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از (Jiang و همکاران، ۲۰۰۶):

27 F (5'-  
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')  
1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')  
محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز مشاهده شد و باند ۱۵۰۰ bp متعلق به جنس اسید لاکتیک بود. سپس باندهای به دست آمده پس از تخلیص جهت تعیین سکانس به شرکت 1st base مالزی فرستاده شدند. تمامی سکانس‌های به

اکسیدانی باکتری‌های LAB توسط برخی از محققین مطرح شده است (Lobo و همکاران، ۲۰۰۹; Ou و همکاران، ۲۰۱۰). مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیکی شامل اعضای جنس لاکتوباسیلوس-ها، بیفیدوباکتریوم‌ها و انتروکوکوس‌ها می‌باشند. توانایی تحمل به اسید و نمک‌های صفراوی دو ویژگی اساسی هستند که توانایی زنده ماندن میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در قسمت‌های بالایی دستگاه گوارش را نشان می‌دهند (Buntin و همکاران، ۲۰۰۸). انتروکوک‌ها باکتری‌های اسیدلاکتیکی هستند که نقش مهمی در محیط زیست، مواد غذایی و میکروبی‌شناسی بالینی دارند. علاوه بر این، ساکنین طبیعی دستگاه گوارش انسان و حیوان نیز می‌باشند (Bhardwaj و همکاران، ۲۰۱۱). این باکتری‌ها همچنین به صورت طبیعی یا گاهی به طور عمدی به غذاهای تخمیری اضافه می‌شوند و به بافت و طعم آن‌ها کمک می‌کنند. علاوه بر این، چند گونه از جنس انتروکوکوس‌ها به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند که ممکن است تعادل میکروبی روده را بهبود بخشند و یا می‌توانند در درمان التهاب معده و روده‌ها در انسان‌ها و حیوانات مورد استفاده قرار بگیرند (Giraffa، ۲۰۰۳; Moreno و همکاران، ۲۰۰۶).

امروزه انتروکوک‌ها، دومین علت اصلی عفونت‌های دستگاه ادراری و سومین علت اصلی باکتری‌می بیماری‌زایی نیز شناخته می‌شوند (Rahimi و همکاران، ۲۰۰۷). اکثر عفونت‌های انتروکوکوسی انسان به وسیله انتروکوکوس فکالینس و انتروکوکوس فاسیوم ایجاد می‌شوند. همچنین تعداد کمی از موارد عفونت‌های انسانی به وسیله گونه‌های دیگر انتروکوک‌ها مانند انتروکوکوس دورانس، انتروکوکوس گالیناروم و انتروکوکوس کاسلی‌فلاووس گزارش شده است (Rahimi و همکاران، ۲۰۰۷). انتروکوکوس فاسیوم باکتریوسین‌هایی تولید می‌کند که باکتری‌هایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند و همچنین پاتوژن‌های روده‌ای را مهار می‌کند. برخی از انتروکوک‌ها مانند انتروکوکوس فاسیوم (Ryan and Ray، ۲۰۰۴) دارای خواص مفید بیوتکنولوژیکی و کاربردی از جمله فعالیت آنتی لیستریایی می‌باشند (Kıvanç و همکاران، ۲۰۱۶). هدف از این تحقیق، تعیین بی‌ضرری نمونه‌های

<sup>1</sup>- DeMan Rogosa and Sharpe

<sup>3</sup> - Brain Heart Infusion

های مورد استفاده به منظور تشخیص فعالیت ضد میکروبی است. در این روش باکتری پاتوژن مورد بررسی به میزان ۱۰۰ میکرولیتر درون محیط BHI آگار و MRS آگار ۱٪ اضافه می شود و پس از ریختن درون پلیت، حفراتی درون آن ایجاد می شود. سپس باکتری مورد نظر به میزان ۱۰ میکرولیتر درون حفرات ایجاد شده اضافه می شود. (Todorov and Dicks, ۲۰۰۵).

بررسی حساسیت/اتروکوک ها نسبت به آنتی بیوتیک ها مقاومت باکتری های منتخب نسبت به ۱۷ نوع آنتی بیوتیک انتخاب شده با روش انتشار دیسک<sup>۱۰</sup> بررسی شد (Brit Robinson, ۲۰۰۸). آنتی بیوتیک های انتخابی شامل، سفازولین (۳۰ μg)، داکسی سایکلین (۳۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، انروفلوکساسین (۱۵ μg)، سفالوتین (۳۰ μg)، ایمی پنم (۱۰ μg)، آگزالین (۱ μg)، آموکسی سیلین (۲۵ μg)، سفالکسین (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، آمپی-سیلین (۱۰ μg) وانکومایسین (۳۰ μg)، تراسایکلین (۳۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، پنی سیلین (۱۰ μg)، کلیندامایسین (۲) و اریترومایسین (۱۵ μg) بود. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد.

### بررسی فنوتیپی ویروالانس در اتروکوک های منتخب با استفاده از روش های بیوشیمیایی

سویه های منتخب از نظر فنوتیپی جهت بررسی حضور یا عدم حضور ویروالانسی با استفاده از آزمایش های، همولایزین، هیدرولیز DNA، هیالورونیداز و تولید لیپاز، لسیتیناز و کواگولاز (Morales و همکاران، ۲۰۱۲؛ Rabbani و همکاران، ۲۰۱۵؛ Eaton and Gasson, ۲۰۰۱؛ Franz و همکاران، ۲۰۰۱؛ Anderson and Gilliland, ۱۹۹۹) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### بررسی ژن های ویروالانس در اتروکوک های جدا شده

پس از بررسی فنوتیپی ژن های ویروالانسی در نمونه ها با استفاده از روش های بیوشیمیایی، ژن های ویروالانسی با استفاده از روش های مولکولی و انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) و پرایمرهای اختصاصی (Specific) مربوطه (Vankerckhoven و همکاران، ۲۰۰۴) بررسی شدند.

<sup>10</sup> - *Escherichia coli* (RTCC1174)

<sup>11</sup> - *Staphylococcus aureus* (RTCC1240)

<sup>12</sup> - disk diffusion

دست آمده با برنامه Blast<sup>۴</sup> در حد گونه شناسایی و ثبت شدند. بررسی خصوصیات پروبیوتیکی اتروکوک ها

### بررسی مقاومت به اسید

به منظور بررسی مقاومت باکتری های منتخب به اسید، از محیط مایع MRS استریل که به کمک اسید کلریدریک<sup>۵</sup> ۱۰ نرمال و سود<sup>۶</sup> ۱۰ نرمال، pH آن به ترتیب به ۴، ۶/۵، ۳، ۲/۵، ۲ رسانده شده بود، استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های تازه کشت شده به این محیط انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و در زمان های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت رشد باکتری ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد (Al-Saleh و همکاران، ۲۰۰۶؛ Başıyigit و همکاران، ۲۰۰۶).

بررسی مقاومت به نمک صفر

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های تازه رشد کرده به محیط های MRS مایع حاوی ۰/۳، ۰/۷، ۱ درصد نمک صفرای استریل، اضافه شد. سپس رشد باکتری ها در زمان ۰، ۲، ۴، ۸، ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و سپس ضریب بازدارندگی نمونه ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Al-Saleh و همکاران، ۲۰۰۶؛ Başıyigit و همکاران، ۲۰۰۶).

$$\text{Cinh} = \frac{(\Delta T8 - T0 \text{ control} - \Delta T8 - T0 \text{ treatment})}{\Delta T8 - T0 \text{ control}}$$

بررسی اثر ضد میکروبی سویه های منتخب بر علیه باکتری های بیماری زا

اثر ضد میکروبی باکتری های منتخب، بر علیه باکتری های بیماری زا شامل: سالمونلا تیفی (بومی)<sup>۷</sup>، سودوموناس آئروژینوز (RTCC1483)<sup>۸</sup>، کلبسیلا پنومونیا (RTCC1254)<sup>۹</sup>، اشیریشیا کولای (RTCC1174)<sup>۱۰</sup>، استافیلوکوکوس اورئوس (RTCC1240)<sup>۱۱</sup> و با استفاده از روش حفره ای سنجیده شد. این روش یکی از معمول ترین روش -

<sup>4</sup> - Nucleotide blast: Basic Local alignment search tool

<sup>5</sup> - HCL

<sup>6</sup> - NaOH

<sup>7</sup> - *Salmonella typhi*

<sup>8</sup> - *Pseudomonas aeruginosa* (RTCC1483)

<sup>9</sup> - *Klebsiella pneumoniae* (RTCC1254)

جدول ۱- پرایمرهای مربوط به ژن‌های ویرولاسی

ژن	نام پرایمر	توالی	باند
gelE	GEL11	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	213 bp
	GEL12	AGATGCACCCGAAATAATATA	
Hyl	HYLn1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276 bp
	HYLn2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	
cylA	CYT1	ACTCGGGGATTGATAGGC	688 bp
	CYT11b	GCTGCTAAAGCTGCGCTT	
Asa1	ASA11	GCACGCTATTACGAACTATGA	375 bp
	ASA12	TAAGAAAGAACATCACCACGA	
Esp	ESP14F	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG	510 bp
	ESP12R	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	
cylM	TE13	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT	742 bp
	TE14	TGAGTTGGTCTGATTACATTT	
cylB	TE15	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	843 bp
	TE16	AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	
agg	TE3	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	1553 bp
	TE4	AAACGGCAAGACAAGTAAATA	
efaAfs	TE5	GACAGACCCTCACGAATA	705 bp
	TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA	
efaAfm	TE37	AACAGATCCGCATGAATA	735 bp
	TE38	CATTCATCATCTGATAGTA	

### بررسی ژن‌های مقاومت به ونکومايسين

قرار گرفتند. ژن‌های مورد بررسی و مشخصات آن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

ژن‌های مقاومت به ونکومايسين در سويه‌های منتخب مورد بررسی، طبق روش‌های ذکر شده توسط محققين ديگر (Kos VN و همکاران، ۲۰۱۲؛ Miele و همکاران، ۱۹۹۵) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی

جدول ۲- لیست پرایمرهای مربوط به ژن‌های مقاومت به ونکومايسين

ژن	پرایمر	توالی	باند
vanA	vanA	ATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATAC	1029 bp
	vanA1	CCCCTTTAACGCTAATACGAT	
vanR	vanRvanR	AGCGATAAAATACTTATTGTGGA	645 bp
	vanR1	CGGATTATCAATGGTGTTCGTT	
vanH	vanHvanH	ATCGGCATTACTGTTTATGGAT	943 bp
	vanH1vanH1	TCCTTTCAAATCCAAACAGTTT	
vanY	vanYvanY	ACTTAGGTTATGACTACGTTAAT	866 bp
	vanY1vanY1	CCTCCTTGAATTAGTATGTGTT	

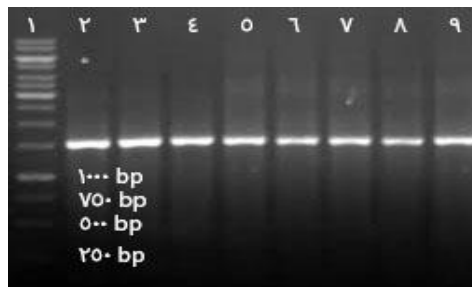
## نتایج

باندی به اندازه bp ۱۵۰۰ ایجاد کردند (شکل ۱). پس از تعیین توالی و با استفاده از ابزار BLAST blast.ncbi.nlm.nih.gov، نمونه‌ها در حد گونه شناسایی شدند. طبق نتایج به دست آمده تمامی نمونه‌ها دارای مشابهت بین ۹۸-۹۹ درصد به انتروکوک فاسیوم، فکالیس، هومنیس، موندتی، دورانس و هایره بودند.

پس از انجام کشت و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیک، ۸ نمونه باکتری اسیدلاکتیک که کوکسی و کوکوباسیل‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و آلفا همولیتیک بودند جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند. همه نمونه‌های منتخب، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 16SrRNA و با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و 1492R،

جدول ۳- باکتری‌های شناسایی شده پس از تعیین توالی

ردیف	کد شناسایی	سویه شناسایی شده	درصد شباهت پس از شناسایی
۱	TA007	انتروکوکوس فاسیوم	٪۹۹
۲	TA0012	انتروکوکوس فکالیس	٪۹۸
۳	TA0033	انتروکوکوس فاسیوم	٪۹۸
۴	TA0059	انتروکوکوس هومنیس	٪۹۸
۵	TA00152	انتروکوکوس فاسیوم	٪۹۹
۶	TA00154	انتروکوکوس موندتی	٪۹۸
۷	TA00166	انتروکوکوس دورانس	٪۹۹
۸	TA00177	انتروکوکوس هایره	٪۹۹



شکل ۱- الگوی PCR با پرایمر 27F, 1492R. ۱. مارکر 1 kb. ۲. انتروکوکوس فاسیوم (TA007). ۳. انتروکوکوس فکالیس (TA0012). ۴. انتروکوکوس فاسیوم (TA0033). ۵. انتروکوکوس هومنیس (TA0059). ۶. انتروکوکوس فاسیوم (TA00152). ۷. انتروکوکوس موندتی (TA00154). ۸. انتروکوکوس دورانس (TA00166). ۹. انتروکوکوس هایره (TA00177).

محیط اسیدی را داشته و در این مدت افزایش رشد چشمگیری داشتند. جدایه TA0033 در زمان‌های ۱ ساعت و ۲ ساعت در pH ۴، ۲/۵ و ۲ کاهش رشد داشته و در pH ۳ و ۶/۵ به میزان

در طی بررسی تحمل به اسید و نمک صفرا مشخص شد که جدایه‌های TA007, TA0012, TA0059 و TA00166 در pHهای مختلف در مدت ۴ ساعت توانایی زنده ماندن در

استرپتوکوکوس آگالاکتیه و نمونه TA0012 نیز بر علیه انتروکوکوس فکالیس اثر مهارى نداشتند.

در بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک، با توجه به قطر هاله‌های تشکیل شده مشاهده شد که همه جدایه‌ها به جز سویه TA00154 نسبت به نالیدیکسیک اسید و تری متوپریم سولفاماتاکسازول، مقاوم بودند. همه سویه‌ها به تتراسایکلین، سفالوتین، آموکسی سیلین، سفازولین و داکسی سایکلین حساسیت نشان دادند. به استثنای موارد ذیل، تمامی جدایه‌ها به پنی سیلین، کلرامفنیکل، کلیندامایسین، اریترومایسین و ایمی پنم حساسیت نشان دادند و TA0059 مقاوم به پنی سیلین، TA0012 مقاوم به کلرامفنیکل، کلیندامایسین و اریترومایسین و TA007 مقاوم به ایمی پنم بودند.

مقاومت فنوتیپی مارکرها در سویه های انتروکوکسی انتخابی: NA (Nalidixic Acid); CHL (Chloramphenicol); G (penicillin); ERY (erythromycin). مقاومت

ژنوتیپی به ونکومایسین توسط ژن VAN ایجاد میگردد  
نتایج آزمایش های بیوشیمیایی جهت ارزیابی ویرولانسی در نمونه های مذکور در جدول زیر نشان داده شده است.

کمی رشد کردند. جدایه‌های TA00152, TA00154 و TA00177 توانایی تحمل شرایط اسیدی را داشتند اما رشد چشمگیری نداشتند و در برخی موارد کمی کاهش رشد نیز مشاهده شد. همچنین سویه‌های مورد بررسی توانستند در غلظت- های ۰/۳، ۰/۷ و ۱ درصد نمک صفرادر طی زمان‌های ۲، ۴ و ۸ ساعت رشد کنند و این درصدهای مختلف از نمک صفررا ۲۴ ساعت نیز تحمل کنند. جدایه TA00166 بیشترین میزان رشد را در تمامی درصدها از خود نشان داد. تمامی سویه‌ها در زمان ۸ ساعت بیشترین و در زمان ۲ ساعت کمترین میزان رشد را از خود نشان دادند.

در بررسی فعالیت ضد میکروبی تمامی جدایه‌ها بر علیه ۵ پاتوژن، هر ۸ نمونه قابلیت و توانایی مهار عوامل بیماری زایی مورد بررسی را داشته و حتی مایع رویی کشت آن‌ها نیز مانع رشد این عوامل شد. تمامی نمونه‌ها مانع رشد و فعالیت پاتوژن‌های سالمونلا تیفی، انتروکوکوس فیکالیس، اشرشیا کلی و لیستریا مونوسایتوژنر بودند، اما بر روی پاتوژن استرپتوکوکوس آگالاکتیه تنها دو نمونه TA007 و TA00166 قدرت مهار کنندگی را نشان دادند. نمونه TA0033 بر علیه سویه لیستریا مونوسایتوژنر و

جدول ۴- مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های انتروکوکوک به آنتی بیوتیک های رایج

منبع	نمونه ها	سویه شناسایی شده	مقاومت فنوتیپی به آنتی بیوتیک ها	مقاومت ژنوتیپی (ونکومایسین)
شیر بز	TA007	انتروکوکوس فاسیوم	NA+, IMP+	-
پنیر ليقوان	TA0012	انتروکوکوس فکالیس	NA+, CHL+, ERY+	-
شیر مادر	TA0033	انتروکوکوس فاسیوم	NA+	-
شیر مادر	TA0059	انتروکوکوس هومنیس	NA+, G+	-
پنیر سنتی تبریز	TA00152	انتروکوکوس فاسیوم	NA+	Van H <sup>+</sup> , VanR <sup>+</sup>
پنیر سنتی تبریز	TA00154	انتروکوکوس موندتی	NA+	-
پنیر سنتی تبریز	TA00166	انتروکوکوس دورانس	NA+	-
شیر بز	TA00177	انتروکوکوس هایره	NA+	VanA <sup>+</sup>

## جدول ۵- نتایج آزمون های بیوشیمیایی بی ضرری انتروکوک های انتخابی

منبع	نمونه ها	سویه شناسایی شده	همولیز	هیدرولیز ژلاتین	لیپاز	هیالورونیداز	DNase
شیر بز	TA007	انتروکوکوس فاسیوم	-	+	-	-	-
پنیر ليقوان سنتی	TA0012	انتروکوکوس فکالیس	-	+	-	-	-
شیر مادر	TA0033	انتروکوکوس فاسیوم	-	-	-	-	-
شیر مادر	TA0059	انتروکوکوس	-	-	-	-	-
پنیر سنتی	TA00152	انتروکوکوس فاسیوم	-	+	-	-	-
تبریز	TA00154	انتروکوکوس موندتی	-	+	-	-	-
پنیر سنتی	TA00166	انتروکوکوس دورانس	-	+	-	-	-
تبریز	TA00177	انتروکوکوس هایره	-	+	-	-	-

## جدول ۶- بررسی مولکولی و پروتئین موجود در سویه های انتروکوک

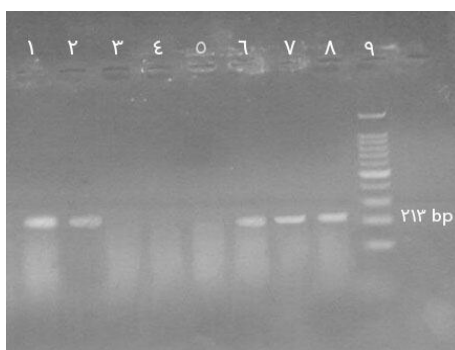
منبع	نمونه ها	سویه شناسایی شده	agg	hyl	esp	gelE	asa1	cylA	cylB	cylM	efaAfs	efaAfm
شیر بز	TA007	انتروکوکوس فاسیوم	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
پنیر ليقوان سنتی	TA0012	انتروکوکوس فکالیس	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
شیر مادر	TA0033	انتروکوکوس فاسیوم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
شیر مادر	TA0059	انتروکوکوس هومنیس	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
پنیر سنتی	TA00152	انتروکوکوس فاسیوم	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
تبریز	TA00154	انتروکوکوس موندتی	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
پنیر سنتی	TA00166	انتروکوکوس دورانس	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
تبریز	TA00177	انتروکوکوس هایره	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+



قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان دادند که تمامی سویه‌ها فاقد ژن‌های *agg*, *hyl*, *esp*, *cylA/M/B*, *efaAfs* بودند و تنها سویه TA00154 فاقد ژن *efaAfm* (شکل ۲) بودند. داشتند. سویه‌های TA0059, TA00152, TA0033 فاقد ژن *geIE* (شکل ۳) بودند. در بررسی ژن مقاومت به ونکومايسين ۴ ژن، VAN H و VAN R VANA, VAN Y، ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند تنها سویه TA00152 دارای ژن‌های VAN H و VAN R و سویه TA00177 نیز ژن VAN A را دارا می‌باشند. همچنین تمامی سویه‌ها فاقد ژن VAN Y بودند (شکل ۴).

ژن‌های ویرولاَنسی سویه‌ها و همچنین ژن مقاومت به ونکومايسين با استفاده از روش‌های ژنوتیپی بررسی شدند و بی‌ضرری سویه‌های مورد نظر تایید گردید.

همانطور که مشاهده شد، گونه‌های انتروکوک جدا شده از شیر مادر فاقد ژن‌های ویرولاَنس بوده و تنها ژن *efaAfm* در آنها مشاهده شد. حضور ژن‌های کدکننده مواد تجمعی (*asa1*)، فعال‌کننده سیتولیزین (*cylA/M/B*)، پروتئین سطحی (*esp*)، هیدرولیز ژلاتیناز (*geIE*)، پروتئین باند شونده کلاژن (*ace*)، آنتی‌ژن اندوکاردیت (*efaA*) و *agg* (کدکننده مواد تجمعی) و غیره با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد بررسی



شکل ۳- الگوی PCR برای بررسی ژن *geIE*. ۱. انتروکوکوس فاسیوم (TA0007) ۲. انتروکوکوس فکالیس (TA0012) ۳. انتروکوکوس فاسیوم (TA0033) ۴. انتروکوکوس (TA0059) ۵. انتروکوکوس فاسیوم (TA00152) ۶. انتروکوکوس موندیتی (TA00154) ۷. انتروکوکوس دورانس (TA00166) ۸. انتروکوکوس هایره (TA00177) ۹. مارکر 100bp



شکل ۴- الگوی PCR با پرایمر VANR, VANR1 (راست)، با پرایمر VANH, VANH1 (چپ)

## بحث

و Rasmussen; ۲۰۱۰، همکاران، Conde-Estévez; همکاران، ۲۰۱۰) بسیاری از گونه‌های انتروکوک به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن‌های بیماری‌زایی مانند چسبندگی و همولیزین مقاوم هستند و

هر چند که انتروکوک در تعداد زیادی از محصولات تخمیری حضور دارند، اما کاربرد آن‌ها به عنوان پروبیوتیک هنوز هم با توجه به جنس‌ها و گونه‌های بیماری‌زا مورد بحث می‌باشد. Shankar و همکاران، ۱۹۹۹، Heikens; و همکاران، ۲۰۰۷

اغلب این ژن‌ها روی پلاسمید قرار دارند که می‌توانند به سویه‌های درونی در دستگاه گوارش انسان منتقل شده و به افزایش بیماری-زایی فاکتورهای ویروالانسی در این گونه‌ها و سویه‌های درون‌زا کمک کنند. بنابراین، ایمنی گونه‌های *انتروکوکوس* مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک باید ابتدا بررسی شده و سپس از مزایای استفاده این گونه‌های جدید از نظر سود یا زیان نیز مطمئن شویم (Araújo and Ferreira, 2013).

با توجه به مطالعات قبلی که بر روی مجموعه *انتروکوکوس*‌های جدا شده از منابع مختلف صورت گرفته بود، داده‌های حاصل از بررسی مقاومت به اسید و نمک صفراوی، در شرایط شبیه سازی شده معده - روده‌ای این پژوهش نشان دادند که حدود ۹۵٪ از ایزوله‌های مورد بررسی دارای مقاومت به اسید و نمک صفرا بوده و از میان آن‌ها ۸۷/۵٪ از ایزوله‌ها توانایی رشد و زنده ماندن در pH های کمتر از ۴ و نمک صفراوی حتی تا ۱٪ را داشتند که در این بین سویه TA00166 (*انتروکوکوس دورانس*) بالاترین میزان رشد و مقاومت را از خود نشان داد. همانند این پژوهش که توسط Pienis و همکارانش صورت گرفت، توانایی زنده ماندن *انتروکوکوس دورانس* LAB18s در برابر شرایط اسیدی، شیره معده شبیه سازی شده در ۳ و موکوس روده‌ای شبیه سازی شده در حضور یا عدم حضور نمک‌های صفراوی نشان داده شده است. نشان داد که *انتروکوکوس فاسیوم* تنها توانایی تحمل به نمک صفرا تا غلظت ۰/۰۵ درصد و pH ۳/۲ را تا ۱۵ ثانیه اول داشت دارند و در ۱۵ ثانیه دوم (۳۰ ثانیه) میزان رشد و زنده ماندن آن‌ها تغییری نیافته است. باکتری‌های پروبیوتیک برای تاثیر بر فلور میکروبی روده باید با پاتوژن‌ها از طریق تولید مواد ضد میکروبی یا رقابت با آن‌ها مقابله داشته باشند (Flahaut و همکاران، ۱۹۹۶). در تحقیق دیگر، با بررسی اثر ضد میکروبی بر روی سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* نشان دادند، سویه‌های مورد بررسی با ایجاد بیشترین قطر هاله (۱۰/۵ میلی‌متر) بر روی پاتوژن *سالمونلا انتریدیدیس* اثر مهاري داشتند (Hafsa و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه‌ای، اثر مهاري باکتری‌های *انتروکوکوس* را بر علیه پاتوژن‌های *لیستریا اینوکوا*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا انتریتیدیس*، *اشرشیا کلی* مورد بررسی قرار دادند و همانند این بررسی، بیشترین اثر مهاري را بر روی سویه‌های

*انتروکوکوس فیکالیس* (۵۵٪)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (۳۰٪) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۲۳٪) مشاهده کردند (Ogaki و همکاران، ۲۰۱۶). یکی از الزامات ایمنی برای باکتری‌های زنده که توسط انسان‌ها مصرف می‌شوند، عدم وجود هرگونه مقاومت اکتسابی آنتی بیوتیک‌ها و فاکتورهای ویروالانسی در آن‌ها می‌باشد. بنابراین، آنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی و عدم وجود ژن‌های ویروالانسی در سویه‌های پروبیوتیک حائز اهمیت است که یکی از ویژگی‌های فنوتیپی از یک گونه می‌باشد (Hong و همکاران، ۲۰۰۹). بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های مورد مطالعه، بر روی ۱۷ نوع آنتی بیوتیک متداول مشخص کرد که همگی به نالیدیکسیک اسید، تری متوپریم و سولفامتاکسازول مقاوم و نسبت به مابقی آنتی بیوتیک‌ها حساسیت داشتند. در صورتی که برخلاف این نتایج گزارش شد که اکثر سویه‌های *انتروکوکوس* مورد بررسی نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بودند (Iweriebor و همکاران، ۲۰۱۵). گونه‌های *انتروکوکوس* دارای ژن‌های ویروالانسی (asa1, hyl, esp, agg, gele, cyla, cylB, cylM, efaAfm, efaAfs) مختلف هستند که عامل اصلی بیماری‌زایی در آن‌ها می‌باشند. چند ژن ویروالانسی مهم *انتروکوکوس*‌های مورد بررسی در این تحقیق نشان دهنده اکثر سویه‌های مورد آزمایش بود. همانند این بررسی، در پژوهشی تمامی سویه‌های مورد بررسی فاقد ژن‌های esp, agg, hyl و cylAMB بوده و برخی حامل یک یا چند ژن ویروالانسی بودند که مشخص شد ۶۲/۵٪ از تمامی سویه‌ها حامل gele (فعالیت هیدرولیز ژلاتین) بوده که به طور کامل (۱۰۰٪)، هر ۸ سویه به صورت فنوتیپی این فعالیت را نشان دادند (Paulsen و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین، حضور یک ژن خاص به طور معمول به معنی بیان فنوتیپی آن نمی‌باشد که نشان می‌دهد وجود ژن خاموش و بیان ژن gele بستگی به شرایط محیطی و وضعیت کشت دارد. این بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی نیاز به ایمنی سویه‌های *انتروکوکوس* دارد (Duprè و همکاران، ۲۰۰۳). همانند نتایج به دست آمده در این مطالعه که هیچ یک از سویه‌ها دارای ژن hyl نبودند، در مطالعه‌ای بیان کردند، سویه‌های *انتروکوکوس*، در طی بررسی ژن‌های ویروالانسی حامل ژن hyl نیستند (Billström و همکاران، ۲۰۰۸). این نتایج

گلیکوپپتیدها در سطح بالایی مقاوم بودند و یک مقاومت سینرژسمی بین عوامل دیواره سلولی در مقابل (آمپی سیلین، پنی سیلین، ونکومايسين) و آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. اکثر سویه‌ها حامل ژن‌های مقاومت به ونکومايسين نبودند و تنها سویه TA00152 حامل vanH و vanR بود. در مطالعه‌ای، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از میان نمونه‌های انتروکوک، ۱۷ نمونه مقاوم به vanA، ۷ نمونه به vanB و ۶ نمونه مقاوم به vanC را در میان سویه‌های انتروکوک جدا شده از منابع مختلف مورد بررسی قرار دادند. از آنجایی که درجه بالایی از همولوژی حدود ۷۴٪ بین vanA و vanB وجود دارد، مهم است که پرایمرها بر اساس این قسمت ژن‌ها طراحی شوند (Miele و همکاران، ۱۹۹۵). انتروکوکوس فاسیوم TA0033 جدا شده از شیر انسان کاملاً فاقد شاخصهای ویروالانس بود و هیچیک از ویژگی‌های ویروالانس فنوتیپی و ژنوتیپی در این سویه مشاهده نشد.

### نتیجه‌گیری

در این تحقیق شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی سویه‌های باکتری‌های انتروکوک بومی جداسازی و بررسی ویژگی‌های پروبیوتیکی این باکتری‌ها به منظور پیشنهاد آن‌ها به عنوان میکروارگانسیم‌های پروبیوتیک، با استفاده از روش‌های استاندارد ملی و بین‌المللی انجام گرفت. همه جدایه‌های انتروکوکوس بررسی شده در این مطالعه، دارای ژنهای ویروالانس بودند به جز انتروکوکوس فاسیوم TA0033 و TA0059 که از شیر مادر جدا شده بودند. این سویه‌ها فاقد فاکتورهای ویروالانس بوده و در نتیجه میتوانند به عنوان پروبیوتیک مناسب و قابل استفاده در مکمل‌های غذایی انسانی و دامی باشند.

هم‌اکنون پروبیوتیک‌های انسانی و دامی از مرحله تحقیق فراتر رفته و وارد تولید تجاری شده‌اند. علاوه بر سویه‌هایی که غالباً به صورت محصولات وارداتی تحت عنوان پروبیوتیک وارد کشور می‌شوند و توسط روش‌های استاندارد پروبیوتیک بودن آن‌ها تشخیص و تایید می‌شود، لازم است سویه‌های بومی نیز شناسایی و تعیین ویژگی‌ها شوند که این کار مستلزم این است که از نظر ایمنی و مقاومت دارویی قبل از وارد شدن به صنعت بررسی شوند و با تولید انبوه آن‌ها به خودکفایی برسیم.

متضاد با نتایج به دست آمده از مطالعات Vankerckhoven و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بود که حضور ژن hyl را در ۱۷٪ از ۲۷۱ نمونه انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از ۸ کشور اروپایی مشاهده کردند و نیز Rice و همکارانش (۲۰۰۳) که آن‌ها نیز بیان کردند، ژن hyl تنها در ۳٪ نمونه‌های اروپایی وجود دارد. با توجه به یافته‌های محققان دیگر (Eaton and Gasson، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲)، ژن esp در ۸۰٪ نمونه‌های انتروکوکوس فاسیوم مشاهده شد که در نقطه مقابل با یافته‌های شانکار و همکارانش (۱۹۹۹) نیز می‌باشد، که عدم وجود ژن esp را در سویه انتروکوک فاسیوم گزارش دادند (Shankar و همکاران، ۱۹۹۹). در این بررسی هیچ یک از سویه‌های انتروکوک حامل ژن esp نبودند. در این مطالعه تمامی سویه‌های انتروکوک مورد بررسی فاقد ژن‌های cyaABM بودند که مشابه با نتایج و Eaton همکارانش می‌باشد (Eaton and Gasson، ۲۰۰۱) و با نتایج گزارش شده توسط دیگر محققان برای حضور یک یا بیشتر این ژن‌ها مغایرت دارد. همچنین، ۵۰٪ از سویه‌های انتروکوک در این مطالعه دارای ژن asal بودند. گروهی از محققان نیز در ۶۳/۵٪ از نمونه‌های انتروکوکوس فاسیوم که بیشتر به عفونت‌های غیر تهاجمی مربوط می‌شود، این ژن را نشان دادند (Creti و همکاران، ۲۰۰۴). مشابه این مطالعه، گروهی، یک ایزوله انتروکوک فاسیوم geIE مثبت را بدون داشتن فعالیت فنوتیپی ژلاتیناز (Eaton و همکاران، ۲۰۰۱) و گروهی دیگر، ۱۳٪ ایزوله‌های انتروکوکوس فاسیوم بالینی دارای ژن asal را پیدا کردند (Elsner و همکاران، ۲۰۰۰). در این پژوهش، ژن کد کننده efaAfs در تمامی نمونه‌ها به جز نمونه TA00154 (انتروکوکوس موندتی) مشاهده شد. ژن efaA با توجه به مطالعات قبلی در سویه انتروکوکوس فیکاليس یافت شد. در طی بررسی ژن ویروالانسی agg مشخص شد که هیچ کدام از سویه‌های مورد بررسی حامل ژن agg (کد کننده مواد تجمعی) نبوده و در صورتی که برخلاف این نتایج در تحقیقی نشان دادند که ۷۳/۳٪ از سویه‌های انتروکوک دارای این ژن بودند (Jimenez و همکاران، ۲۰۱۳). سویه‌های انتروکوکوس از نظر داشتن ژن مقاومت به ونکومايسين نیز بررسی شدند. انتروکوک‌ها به

## منابع

- Al-Saleh A, Metwalli A. M and Abu-Tarboush H. M.(2006). Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. *Journal of the Saudi Society of food and nutrition*. 1: 1-16.
- Anderson, J. W. and S. E. Gilliland .(1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition* .18(1): 43-50.
- Araújo, T. F. and C. L. d. L. F. Ferreira .(2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian archives of biology and technology* .56(3): 457-466.
- Başığit G, Kuleşan H, Karahan AG. (2006). Viability of human-derived probiotic *lactobacilli* in ice cream produced with sucrose and aspartame. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 33(9): 796-800.
- Bhardwaj A, Kaur G, Gupta H, Vij S, Malik R.( 2011). Interspecies diversity, safety and probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* isolated from dairy food and human faeces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(3): 591-602.
- Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International journal of antimicrobial agents*. 32(5): 374-377.
- Britz, T. and R. K. Robinson.(2008). *Advanced dairy science and technology*, John Wiley & Sons. the trusted publisher of academic, scientific, and professional books since 1807.
- Buntin,N,Chanthachum,Sand ongpattarakere,T (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 30 (Suppl.1), 141-148.
- Conde-Estévez D, Sorli L, José Antonio Morales-Molina J.A, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, Horcajada J.P, Grau S. (2010). Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(6): 342-348..
- Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L.(2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology*. 53(1):13-20.
- Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*. 52(6): 491-498.
- Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:24-27.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson .(2001).Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*. 67(4): 1628-1635.
- Eaton, T. J. and M. J. Gasson .(2002). A variant *enterococcal* surface protein Espfm in *Enterococcus faecium* ;distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS microbiology letters* .216(2): 269-275.
- Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 19(1): 39-42.

- Flahaut, S., et al. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS microbiology letters*. 138(1): 49-54.
- Franz C.M, Muscholl-Silberhorn A.B, Yousif N.M.K, Vancanneyt M, Swings J and Holzapfel W.H. ( 2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4385-4389.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of *enterococci* in dairy products. *International journal of food microbiology*. 88(2): 215-222.
- Hafsa S. H, Mendonca A, Brehm-Stecher B, Hassan A. A, Ibrahim S. A. (2015). Probiotic Potential and Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* Isolated from Chicken Caecal and Fecal Samples. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering*. 9(4): 359-363.
- Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. (2007). *Enterococcal* surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of bacteriology*. 189(22): 8233-8240.
- Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U.( 2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2):365s-73s.
- . (2009). *Bacillus subtilis* isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology*. 160(2):134-43.
- Iweriebor BC, Gaqavu S, Obi LC, Nwodo UU, Okoh AI. (2015). Antibiotic susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from hospital and domestic wastewater effluents in Alice, eastern cape province of South Africa. *International journal of environmental research and public health*. 12(4): 4231-4246.
- Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology*. 72(6): 3832-3845.
- Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among *enterococci* from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC microbiology*. 13(1): 1.
- Kıvanç SA, Kıvanç M, Yiğit T. (2016). Antibiotic susceptibility, antibacterial activity and characterisation of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Experimental and therapeutic medicine* .12(3): 1732-1740
- Kos V. N, Desjardins C.A, Griggs A, Cerqueira G, Van Tonder A, Holden M.T.G, Godfrey P, Palmer K.L, Bodi K, Mongodin E.F, Wortman J, Feldgarden M, Lawley T, Gill S.R, Haas B.J, Birren B, Gilmore M.S.(2012). Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with Methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. *MBio( bimonthly peer-reviewed open access scientific journal)*. 3(3): e00112-00112.
- Lin, M.-Y. and F.-J. Chang .(2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive diseases and sciences*. 45(8): 1617-1622.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.( 2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* .4(8): 118-26.
- Miele A, Bandera M, Goldstein BP. (1995). Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in *enterococci* and to study gene

- organization in VanA isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39(8): 1772-1778.
- Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva A Jr, Franco BD, Nero LA. (2012). Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 113:318-328.
- Moreno M. F, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International urnal of food microbiology*. 106(1): 1-24.
- Ogaki, M, Rocha KR, Terra MR, Furlaneto MC, Maia LF. (2016). Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *Journal of microbiology and biotechnology*. 28;26(6):1026-34.
- Ou C.C, Lu T.M, Tsai J.J, Yen J.H, Chen H.W, Lini M.Y.( 2009). Antioxidative Effect of Lactic Acid Bacteria: Intact Cells vs Intracellular Extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol. 17 Issue 3, p209-216.
- Paulsen IT, Banerjei L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM.(2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. 299(5615): 2071-2074.
- Pieniz S, Andrezza R, Anghinoni T, Camargo F, Brandelli A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control* .37: 251-256.
- Rabbani M, Shafiee F, Shayegh Z, MirMohammadSadeghi H, Samsam Shariat Z, Etemadifar Z, Moazen F. (2015). Isolation and Characterization of a New Thermoalkalophilic Lipase from Soil Bacteria. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* .14(3): 901-6.
- Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. (2007). Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iranian Biomedical Journal*. 11(3): 161-167.
- Rasmussen M, Johansson D, Söbirk SK, Mörgelin M, Shannon O. (2010). Clinical isolates of *Enterococcus faecalis* aggregate human platelets. *Microbes and Infection*. 12(4): 295-301.
- Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, Klare I, Nallapareddy SR, Huang W, Murray BE.. (2003). A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *Journal of Infectious Diseases*. 187(3): 508-512.
- Ryan KJ, Ray CG.(2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 294-5. ISBN: 0-8385-8529-9.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity*. 67(1): 193-200.
- Todorov, S. and L. Dicks .(2005). Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 36(2): 318-326.
- Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H.( 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): 4473-4479.