Archive of SID

ORIGINAL ARTICLE

Antibiogram Analysis and Detection of Pathogenicity Genes in Two Strains of Enterococcus faecium Isolates from Oak Sap (Quercus brantii var. Persica)

Elham Mousavi[1],
Farhad Nazarian-Firouzabadi[2],
Ahmad Ismaili[3]

[1] MSc Student in Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
[2] Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
[3] Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received July 20, 2016 ; Accepted February 6, 2017)

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

Abstract

Background and purpose: Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in human and other organisms life. Some of LABs kill pathogenic and other harmful microorganisms. *Enterococcus* are, gram-positive, catalase-negative, cocci forming, non-sporogenesis, and facultative anaerobic bacteria. This study was done to identify and isolate possible probiotic bacteria with benefits to human health from Persian oak sap (*Quercus brantii* var. *persica*). The aim was to identify beneficial bacteria for plant pathogenic biological control and industrial applications.

Materials and methods: LABs were identified using conventional methods, including culture dependent methods and 16S rRNA sequencing method. Antibiogram analysis was performed and the presence of virulence genes, including *efa*A (endocarditis antigen), *as*, *ace*, *esp* and *gel*E was examined by PCR.

Results: It was found that out of 285 colonies, 160 (56.1%) were catalase-negative and gram-positive. Results of 16S rRNA sequencing showed that the bacteria isolated bacteria belong to the *Enterococcus Faecium* species. *E. faecium* strains of this study were sensitive to a number of clinically important antibiotics such as vancomycin, ampicillin, ciprofloxacin, and nitrofurantoin. Two strains of *E. faecium* bacteria, one with the ability to produce Co_2 from glucose (KX185054) and one with no Co_2 production ability (KX185055) were identified. The 16S rRNA sequence of identified strains were deposited in NCBI database. PCR amplification did not amplify virulence genes except *efa*A (endocarditis antigen).

Conclusion: In this study, two different *E. faecium* strains were isolated from the oak which can be good candidates for probiotics and biological control.

Keywords: lactic acid, oak, antibiotics, pathogenicity gene, *Enterococcus faecium*

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (146): 31-46 (Persian).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۶ اسفند سال ۱۳۹۵ (۴۶-۳۱)

بررسی طیف آنتی‌بیوگرام و ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی دو سویه انتروکوکوس فاسیوم جداسازی شده از شیره‌ی درخت بلوط (*Quercus brantii* var. *persica*)

الهام موسوی[۱]
فرهاد نظریان فیروزآبادی[۲]
احمد اسماعیلی[۳]

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های اسیدلاکتیک نقش مهمی در زندگی انسان و سایر موجودات زنده بازی می‌کنند. برخی از آن‌ها مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا می‌شوند. باکتری‌های انتروکوکوس، گرم مثبت، کاتالاز منفی، کوکسی شکل، غیر اسپورزا و بی‌هوازی اختیاری هستند. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از شیره درخت بلوط (*Quercus brantii* var. persica) به‌منظور معرفی باکتری‌های مفید جهت کاربرد در مبارزه بیولوژیک و به‌عنوان باکتری‌های صنعتی بود.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در شیره‌ی گیاه با روش‌های متداول کشت، خواص بیوشیمیایی و توالی‌یابی ۱۶SrRNA شناسایی شدند. الگوی مقاومت این سویه‌ها نسبت به برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین وجود ژن‌های بیماری‌زایی *efaA* (آنتی‌ژن اندوکاردیتیس)، *as*، *ace*، *esp* و *gelE* به کمک روش PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که از بین ۲۸۵ کلنی اولیه، تعداد ۱۶۰ کلنی (۵۶/۱ درصد) کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند. نتایج توالی‌یابی ۱۶S rRNA نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده به گونه‌ی انتروکوکوس فاسیوم تعلق دارند. سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم با الگوهای متفاوتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و نیتروفورانتوئین حساس بودند. دو سویه باکتری انتروکوکوس فاسیوم یکی با توانایی تولید گاز Co_2 از گلوکز (KX185054) و دیگری ناتوان در تولید گازCo_2 (KX185055) شناسایی و توالی آن‌ها در پایگاه NCBI ثبت گردید. در آزمون شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی، هر دو سویه تنها دارای ژن *efaA* (آنتی‌ژن اندوکاردیتیس) بودند.

استنتاج: در نتیجه این مطالعه، دو سویه انتروکوکوس فاسیوم از بلوط جداسازی شدند که می‌توانند کاندید مناسبی برای بررسی‌های بیشتر به عنوان پروبیوتیک و کنترل بیولوژیکی باشند.

واژه های کلیدی: اسیدلاکتیک، بلوط، آنتی‌بیوتیک، ژن بیماری‌زایی، انتروکوکوس فاسیوم

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که در انسان یا حیوان، با اثر بر روی فلور میکروبی بدن، اثرات مفیدی برسلامت میزبان دارند. اکثر پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی دستگاه گوارش موجودات زنده از جمله انسان هستند که در آن‌جا زندگی همسفرگی

مولف مسئول: فرهاد نظریان فیروزآبادی- خرم آباد: دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی Email: nazarian.f@lu.ac.ir
۱. دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۲. استاد، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۴/۳۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۵/۱۲ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱۱/۱۸

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

بی‌ضرری دارند(۲،۱). باور موجود در مورد اثرات مفید پروبیوتیک‌ها بر پایه این واقعیت قرار دارد که فلور میکروبی روده نقش محافظت‌کننده‌ای در برابر بیماری‌های مختلف از خود نشان می‌دهد(۳). اولین مطالعات بالینی برروی پروبیوتیک‌ها در دهه ۱۹۳۰ در مورد اثربخشی در یبوست انجام شد. از آن به بعد، تعداد این مطالعات در اروپا و آسیا افزایش یافت(۴). اخیرا آزمون‌های بالینی، اثرات مفید باکتری‌های پروبیوتیک از قبیل پیشگیری از اسهال، متعادل کردن میکروفلور روده، تحریک سیستم ایمنی، خصوصیات ضد توموری و اصلاح عدم تحمل لاکتوز را نشان داده‌اند. همچنین محققان نشان داده‌اند که باکتری‌های پروبیوتیک با تولید باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی، رشد و تکثیر پاتوژن‌های بیماری زا را مهار می‌کنند(۵). در میان میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسیدلاکتیک مهم‌ترین گروه موجودات زنده‌ی مفید هستند. همچنین در میان باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های دو جنس لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس جزء فلور طبیعی دستگاه گوارش و غذاهای تخمیری محسوب می‌شوند(۶). باکتری‌های جنس انتروکوکوس، ارگانیسم‌هایی گرم مثبت، کاتالاز منفی، کوکسی شکل، غیر اسپورزا، بی‌هوازی اختیاری، هموفرمانتاتیو با احتیاجات غذایی پیچیده‌ای هستند(۷) که اغلب در اکثر سبزیجات، گیاهان و مواد غذایی مخصوصا غذاهایی با منشاء حیوانی مانند محصولات لبنی حضور دارند. این باکتری‌ها هم‌چنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده بعضی از پستانداران و انسان را تشکیل می‌دهند(۸). تعداد قابل توجهی از سویه‌های متعلق به گونه‌های متفاوت جنس انتروکوکوس دارای خواص بیولوژیکی یکسان مانند؛ تولید باکتریوسین و رفتارهای پروبیوتیکی هستند. مقاومت استثنایی این باکتری‌ها باعث توانایی رشد آن‌ها در محیط‌های خارج روده‌ای می‌گردد. از این رو در خاک، آب‌های سطحی، روی گیاهان و سبزیجات هم مشاهده شده‌اند(۹). به علاوه، انتروکوک‌ها دارای توانایی اکتساب فاکتورهای مقاومت دارویی متعددی هستند که مشکلات جدی در کنترل و مراقبت بیماران مبتلا به عفونت‌های انتروکوکی ایجاد می‌نمایند(۷). با وجود آن که مطالعاتی بر روی فاکتورهای بیماریزایی این باکتری‌ها انجام شده است، ولی تاکنون در میان سویه‌های مختلف جدا شده از افراد سالم و بیمار، فاکتورهای بیماریزایی شاخصی که بتوان بیماری‌زایی را به آن‌ها نسبت داد پیدا نشده است. شایع‌ترین عوامل مسبب بیماری‌های انسان توسط این گروه از باکتری ها، دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌باشند(۱۰). گونه‌های انتروکوکوس فکالیس حدود ۸۰ تا ۹۰درصد و انتروکوکوس فاسیوم حدود ۱۰ درصد ازکل عفونت‌های انسانی ناشی از این جنس را به خود اختصاص می‌دهند(۱۱). بیماری‌زایی انتروکوک‌ها توسط ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم‌هایی مانند آنزیم‌های پروتئولیتیک و سیتولیزین (ژلاتیناز و سرین پروتئاز)، چسبندگی (تجمع ماده، پروتئین سطحی انتروکوک (esp)، پروتئین چسبندگی کلاژن (ace)، آنتی‌ژن (efaA) و کپسول و پلی ساکاریدهای دیواره سلولی مرتبط می‌باشد(۱۲).

باکتری‌های اسیدلاکتیکی که به عنوان کشت آغازگر (استارتر) به شیر اضافه می‌شوند، به صورت ذاتی[1] و طبیعی در شیر وجود دارند و نقش مهمی را در طعم و عطر مواد لبنی بازی می‌کنند. از سوی دیگر، برخی باکتری‌های اسیدلاکتیک مانند انتروکوکوس‌ها، به دلیل تولید باکتریوسین‌ها، می‌توانند از رشد باکتری‌های پاتوژن ممانعت به عمل آورند. به همین دلیل، این باکتری‌ها از دیدگاه تکنولوژیکی، حائز اهمیت هستند. برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک خاص، از قبیل؛ لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی، انتروکوکوس فکالیس[2]، انتروکوکوس فاسیوم[3]، لاکتوباسیلوس کورواتوس[4]، لاکتوکوکوس لاکتیس[5] زیرگونه لاکتیس قادرند باکتریوسین تولید کنند(۱۳). امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی

1. indigenous
2. *Enterococcus faecalis*
3. *Enterococcus faecium*
4. *Lactobacillus curvatus*
5. *Lactococcus lactis*

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

چندگانه انتروکوک‌ها به لحاظ بالینی حائز اهمیت می‌باشد(۱۴). در سال‌های اخیر به خاطر اکتساب ژن‌های مقاومت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها توسط باکتری‌های فرصت طلب، این آنتی‌بیوتیک‌ها سودمندی خود را به دلیل توسعه و رشد سویه‌های مقاوم از دست داده‌اند. علاوه بر این مشکلات، در برخی مواقع آنتی‌بیوتیک‌ها همراه با اثرات زیان‌آوری مثل حساسیت شدید، سبب سرکوب ایمنی و ایجاد واکنش‌های حساسیت در انسان می‌شوند. بنابراین توسعه‌ی داروهای ضد میکروبی طبیعی برای درمان بیماری‌های عفونی، با شناسایی باکتری‌های مفید کشنده‌ی سایر باکتری‌های بیماریزا از منابع مختلف، مثل گیاهان دارویی حائز اهمیت است(۱۵). بلوط ایرانی[1] متعلق به خانواده‌ی راش یا بلوط[2] است و گونه‌ی غالب آن در رویشگاه زاگرس می‌روید(۱۶). درختان بلوط از مهم‌ترین و فراوان‌ترین گونه‌های چوبی پهن‌برگ اکوسیستم‌های جنگلی، از جمله جنگل‌های غرب ایران می‌باشند که از دیدگاه زیست محیطی و نیز اقتصادی از اهمیت بسیار بالایی برخوردارند(۱۷). این گونه گیاهی به عنوان گیاهی بسیار ارزشمند و قابل بهره‌وری در بخش‌های صنعتی از قبیل صنایع چوب، کاغذسازی، شیمی، رنگ‌سازی و داروسازی مطرح می‌باشد(۱۸،۱۷). در یکی از مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، سه جدایه از باکتری‌های اسیدلاکتیک میله‌ای شکل و متحرک از شیره‌ی درخت بلوط (Quercus sp.) جداسازی شد که بر اساس مطالعات مولکولی مشخص شد که هر سه جدایه به گونه‌ی جدیدی به نام Lactobacillus sucicola sp. nov. تعلق دارند(۱۹). همچنین در مطالعه‌ای ایریساوا و همکاران (۲۰۱۴)، پیش‌نویس توالی ژنوم یک باکتری اسیدلاکتیک متحرک، Lactobacillus sucicola JCM 15457(T) ، جدا شده از شیره‌ی درخت بلوط را گزارش کردند(۲۰). مطالعات نشان داده است که برخی از باکترهای اسیدلاکتیک نظیر لاکتوباسیلوس‌ها، انتروکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس در شیره‌ی این گیاه زندگی می‌کنند(۱۹،۲۱-۲۴). این مطالعه به منظور شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیره‌ی بلوط به امید یافتن گونه یا سویه‌های جدید برای استفاده در صنایع لبنی و اثبات خواص ضد باکتریایی آن‌ها جهت کنترل بیولوژیکی پاتوژن‌های بیماری‌زای انسانی و گیاهی انجام شده است.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری

از تعداد ۶ نمونه شاخه‌های جوان درخت بلوط مربوط به ۶ درخت مختلف به‌صورت تصادفی در محوطه‌ی دانشکده‌ی کشاورزی به مساحت ۲۰ هکتار در فروردین ماه سال ۱۳۹۴ نمونه‌گیری صورت گرفت و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. لایه‌ی پوست بالایی نمونه‌ها توسط اسکالپل جدا گردید و نمونه‌ها به تکه‌های کوچک‌تری به طول ۱۵-۱۰ سانتی‌متر تقسیم شدند. مراحل شستشو و استریل قطعات شاخه‌ها ابتدا توسط آب مقطر و سپس الکل اتیلیک ۷۰ درصد صورت گرفت.

جداسازی و کشت اولیه

به منظور جداسازی باکتری‌ها، قطعات شاخه به مدت ۲۴ ساعت در سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد (NaCl w/v) قرار داده شدند. سپس محلول سرم فیزیولوژیک موجود از کاغذ صافی استریل عبور داده شد. کاغذهای صافی روی محیط MRS جامد قرار داده شدند. پس از گذشت ۵ دقیقه، کاغذهای صافی از روی محیط کشت برداشته شدند. محیط کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط هوازی انکوبه شدند. پس از رشد و ظهور کلنی باکتری‌ها، از کلنی‌های حاصل، کلنی‌هایی که از لحاظ شکل، اندازه، کدر یا شفاف بودن و سایر ویژگی‌های ظاهری متفاوت بودند به شکل جداگانه و به تصادف انتخاب شدند. در مجموع تعداد ۲۸۵ کلنی انتخاب شد و در محیط MRS جامد تازه کشت داده شدند. عمل بازکشت تا اطمینان از

1. *Quercus Persica*
2. Fagaceae

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

خلوص کلنی‌ها، هر سه روز یک‌بار انجام گرفت. از این تعداد کلنی مجزا و خالص، برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده گردید.

غربال اولیه باکتریایی توسط آزمون‌های بیوشیمیایی

شناسایی مورفولوژیکی ایزوله‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم براساس روش کریستیان گرم(۲۵) و تست کاتالاز بر اساس روش کلارک و کوان(۲۶)، آزمون تخمیر قند گلوکز و تولید گاز دی‌اکسیدکربن حاصل از تخمیر قند گلوکز، رشد در غلظت ۶/۵ درصدکلرید سدیم، رشد در دماهای ۱۵، ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، رشد در pH=۴/۴ و pH=۹/۶ در محیط MRS مورد بررسی قرار گرفت. به‌طور کلی، جهت انجام آزمون گرم، یک قطره از سوسپانسیون باکتری روی یک لام تمیز قرار داده شد و پس از تثبیت سلول‌های باکتری، رنگ‌آمیزی با کیت رنگ‌آمیزی گرم انجام شد پس از شستشو و خشک نمودن اسلاید، اسلایدها زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. در این آزمون باکتری‌های گرم مثبت به رنگ ارغوانی مایل به آبی تیره دیده شدند. به‌منظور تعیین وجود یا عدم وجود آنزیم کاتالاز در باکتری‌ها، از آب اکسیژنه (H_2O_2) و بر اساس روش آکابندا استفاده شد(۲۷). برای انجام آزمون تخمیر قند گلوکز، به هریک از لوله‌های آزمایش، قند گلوکز استریل ۲ درصد و معرف فنل رد به میزان ۰/۵ گرم بر لیتر افزوده شد. پس از تلقیح، باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. تبدیل رنگ قرمز به زرد نشانگر تخمیر قند و تولید اسید در نظر گرفته شد. برای آزمون تولید گاز دی‌اکسیدکربن حاصل از تخمیر قند گلوکز از لوله‌های درهام استفاده شدکه تجمع گاز در لوله‌های درهام و شناور شدن آن‌ها نشانه‌ی مثبت بودن آزمون بود.

آزمون‌های مولکولی

استخراج *DNA*

استخراج DNAی ژنومی با استفاده از روش داس و داش صورت گرفت(۲۸). برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از میزان جذب $OD_{۲۶۰}/OD_{۲۸۰}$ توسط اسپکتروفتومترو الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸درصد استفاده شد.

تکثیر ناحیه‌ی *16S rRNA*

واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی (fD1: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ ; rP2: 5′-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3′) انجام شد(۲۹). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک چرخه‌ی واسرشت‌سازی اولیه (۹۴°C) به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه‌ی واسرشت سازی (۹۴°C) به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگرها به DNA الگو (۵۶°C) به مدت ۱ دقیقه و تکثیر DNA الگو (۷۲°C) به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه تکثیر نهایی در (۷۲°C) به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با بافر کامل (×۱۰) به مقدار ۲/۵µl، dNTP (۱۰۰mM) به مقدار ۰/۵µl، آغازگرهای رفت و برگشت (fD1 و rP2) هر کدام به غلظت ۱۰pm به مقدار ۱µl، آنزیم Taq(۵u/µl) به مقدار ۰/۳µl و DNA (۵۰ng/µl) و با آب مقطر استریل تا رساندن به حجم نهایی (۲۵µl) انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

خالص‌سازی ناحیه‌ی *16S rRNA* و توالی‌یابی

خالص‌سازی DNA بر اساس دستورالعمل کیت از ژل (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. محصول PCR خالص‌سازی شده، توسط روش توالی‌یابی ختم زنجیره‌ی سانجر و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط (fD1 و rP2) صورت گرفت. نتایج حاصل از توالی‌یابی دوطرفه از دو طرف با استفاده از نرم‌افزار Vector.NTI.v10.3 و براساس نقاط همپوشان بین توالی‌ها به صورت کانتیگ درآمد. توالی حاصل از کانتیگ‌ها به کمک ویرایش دستی در نرم‌افزار BioEdit اصلاح شدند و نوکلئوتیدهای نامربوط و مبهم به کمک

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

پیک‌های مربوطه جایگزین شدند. توالی تعداد ۳۱ گونه از انتروکوکوس‌ها وتعداد ۲۴گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک از پایگاه داده NCBI اخذ شد. هم‌ردیفی مربوط به توالی ژن 16S rRNA ایزوله‌ها و سایر نمونه‌های بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار Clustal W صورت گرفت. خروجی هم‌ردیفی با استفاده از تصحیح دستی مرتب و برای ترسیم درخت فیلوژنی آماده گردید. درخت فیلوژنی توالی‌ها پس از بررسی چشمی و هم‌ردیفی دستی با روش Maximum Parsimony به‌وسیله نرم‌افزار MEGA6 ترسیم شد(۳۰). از باکتری Bucillus subtilis به‌عنوان برون گروه در ترسیم درخت فیلوژنی کل باکتری‌های LAB و از باکتری Tetragenococcus solitaries به‌عنوان برون گروه در ترسیم درخت فیلوژنی باکتری‌های جنس انتروکوکوس استفاده شد. ارزش اعتماد شاخه‌های درخت فیلوژنی توسط تجزیه و تحلیل بوت‌استراپ[1] بر اساس تعداد ۱۰۰۰ نمونه‌گیری فلنشتین[2] محاسبه شد(۳۱).

آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک

از محیط کشت نوترینت آگار به عنوان محیط اصلی برای آزمون حساسیت به آنتی‌بیوتیک استفاده شد. به این ترتیب که سوسپانسیون باکتری‌ها حاصل از کشت در محیط نوترینت براث (۰/۵ مک فارلند)، به کمک یک سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. ابتدا تمام سطح پتری به وسیله‌ی سوسپانسیون باکتری آغشته شد تا یک کشت متراکم و یک‌دست تولید شود. سپس از قرص‌های آنتی‌بیوتیک: سیپروفلوکساسین، آمپی‌سیلین، نیتروفورانتوئین، اریترومایسین، آزیترومایسین، جنتامایسین، کوتریموکسازول، سفوتاکسیم، سفتریاکسون، کربنسیلین، تری‌متوپریم، ونکومایسین و پنی‌سیلین (شرکت پادتن طب) به نحوی استفاده شد که هر ۳ عدد قرص با فاصله‌ی مناسب از هم درون پتری‌ها قرار داده شد. بعد از خشک شدن محیط، پلیت‌ها در انکوباتور $37^{o}C$ به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از رشد باکتری، نتایج آزمون مورد بررسی قرارگرفت. عدم رشد باکتری در اطراف هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها به منزله‌ی حساسیت باکتری به آن آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد.

بررسی ژن‌های بیماری زایی

وجود ژن‌های عامل بیماری‌زایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن‌ها (جدول شماره ۱) بررسی شدند. تمامی برنامه‌های PCR شامل: ۳۰ چرخه واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر به مدت ۱ دقیقه در دماهای اختصاصی هر آغازگر و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد در مدت‌زمان ۱ دقیقه بودند(۳۲). لازم به ذکر است که در آزمون تعیین حساسیت و شناسایی ژن‌های عامل بیماری زایی، از باکتری E. faecalis (ATCC 29212) به عنوان شاهد استفاده شد.

جدول شماره ۱: آغازگرهای PCR و شرایط واکنش

نام آغازگر	توالی آغازگر (3′→5′)	طول توالی تکثیر شونده(bp)	دمای اتصال (℃)
ACE1(F)	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	۳۲۰	۵۶
ACE2(R)	TCTATCACATTCGGTTGCG		
gelE1(F)	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC	۴۰۲	۵۶
gelE2(R)	CTTCATTATTTACACGTTTG		
efaA1(F)	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA	۴۹۹	۵۶
efaA2(R)	CTACTAACACGTCACGAATG		
AS1(F)	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	۴۰۶	۵۴
AS2(R)	TAGCTTTTTTCATTCTTGTGTTTGTT		
esp46(F)	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	X repeats	۵۸
esp47(R)	CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG		

مشاهدات میکروسکوپ نوری و الکترونی

بررسی مورفولوژیک تک سلول باکتری با استفاده از میکروسکوپ نوری و یا الکترونی صورت می‌پذیرد و با استفاده از آن خصوصیات ظاهری باکتری از قبیل شکل مورد بررسی قرار می‌گیرد. در این مطالعه کلنی باکتری‌ها با بررسی مورفولوژی آن ها با استفاده از

1. Bootstrap
2. Felsenstein

www.SID.ir

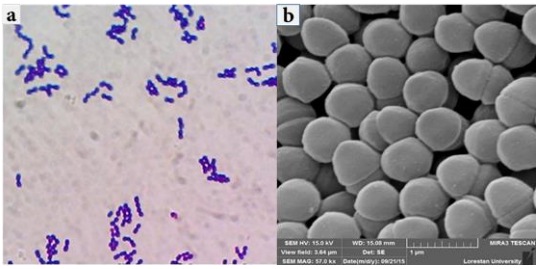
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

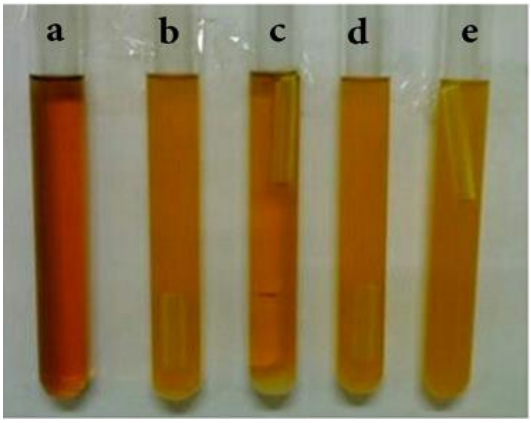
میکروسکوپ نوری و مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفتند. برای آماده‌سازی نمونه‌ها برای عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی از روش گلائورت با استفاده از گلوتارآلدئید[1] استفاده شد(۳۳). پس از تثبیت باکتری‌ها، مراحل آماده سازی باکتری با میکروسکوپ الکترونی انجام شد. برای این کار از دستگاه Desk sputter coater-DSR1 با پوشش نانو ساختار طلا استفاده شد. پس از پوشش سطح سلول باکتری با ذرات طلا، از میکروسکوپ الکترونی مدل FE SEM / Mira3 Lmu و HV= ۲۰ kV برای عکس‌برداری از سطح سلول باکتری استفاده شد.

یافته ها

در این آزمایش از بین ۵۳۴ کلنی اولیه، تعداد ۲۸۵ کلنی (۵۳/۳۷درصد) انتخاب شدند که از لحاظ ویژگی‌های ظاهری نماینده‌ی همه باکتری‌ها بودند. از تعداد کلنی برای آزمون‌های مورد نظر استفاده شد. تعداد ۱۶۰ کلنی (۵۶/۱درصد) کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند. مشاهدات میکروسکوپ نوری با درشت نمایی ۱۰۰× و میکروسکوپ الکترونی نشان داد که باکتری‌ها به شکل کوکسی و در دسته‌های دوتایی و چندتایی قرار دارند که مشخصه‌ی اصلی باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند (تصویر شماره ۱). همه‌ی ۱۶۰ باکتری توانایی تخمیر گلوکز را داشتند، اما تنها ۳۹ کلنی (۲۴/۴ درصد) قادر به تولید گاز بودند (تصویر شماره ۲). به علت شباهت بسیار زیاد بین کلنی‌ها تعداد ۱۰ کلنی از میان ۱۶۰ کلنی انتخاب شدند و آزمون‌های تشخیصی مختلف روی آن‌ها صورت گرفت. از تعداد ۱۰ کلنی انتخابی، همگی توانایی رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی، و pH=۹/۶ را داشتند. تعداد ۳ کلنی (۳۰ درصد) توانایی رشد در pH=۴/۴ و تعداد ۷ کلنی (۷۰ درصد) توانایی رشد در کلرید سدیم (w/v) ۶/۵ درصدرا داشتند.



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپ نوری (۱۰۰×) (a) و الکترونی (b) باکتری‌های اسیدلاکتیک



تصویر شماره۲: آزمون تخمیر قند گلوکز
a) شاهد (محیط MRS فاقد باکتری)
b) باکتری Enterococcus faecalis
c) باکتری Lactobacillus reuteri f275
d) باکتری سویه Enterococcus faecium B (KX185055)
e) باکتری سویه Enterococcus faecium A (KX185054)

با توجه به نتایج آزمون‌های انجام شده، باکتری‌ها در یک گروه فنوتیپی جداسازی شدند. کوکسی‌های کاتالاز منفی، گرم مثبت، هوازی و بی‌هوازی اختیاری که به خوبی قادر به رشد در نمک کلرید سدیم (w/v) ۶/۵ درصدو رشد در دمای ۱۰ و ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و رشد در pH=۹/۶ بودند، به‌عنوان انتروکوکوس در نظر گرفته شدند که از این میان ۳۰ درصد باکتری‌ها قادر به رشد در pH=۴/۴ نیز بودند. از میان باکتری‌های این جنس غالب دو نمونه انتخاب شدند، سویه‌ی انتخابی که قادر به رشد در pH=۴/۴ و عدم تولید گاز بود به نام سویه‌ی B (KX185055) و سویه‌ای که توانست از

1. glutaraldehyde

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

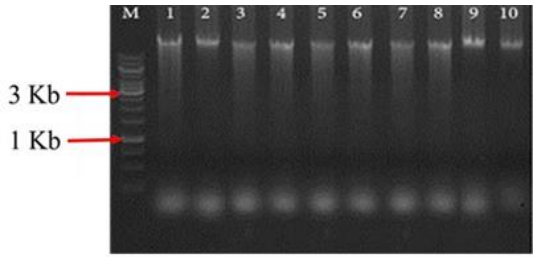
گلوکز گاز تولید کند ولی قادر بـه رشـد در pH=۴/۴ نبـود به نام سویه‌ی A (KX185054) نام‌گذاری و آزمایش‌های بعدی روی آن‌ها انجام شد. برای تشخیص باکتری‌ها در سطح گونه از الگوی تخمیر قندی، آزمون اکسیداسیون یا تخمیر گلوکز (O/F) و آزمون حرکـت بـاکتری استفاده شد که هر دو سویه واکنش‌های مشابهی را نشـان دادنـد جهت شناسایی دقیق‌تر سویه به روش‌های نـوین مولکـولی، پس از استخراج DNA توالی ناحیه 16S rRNA ی آن‌ها تکثیر و به توالی‌یابی ارسال گردیـد (تصـویر شـماره ۳). نتایج توالی‌یابی برای این سویه‌ها در بانک ژن نشان داد، توالی ناحیه‌ی 16S rRNA ی سـویه‌ی A (KX185054) بـا ۹۹درصد تشابه آن در طول ۱۵۳۵ نوکلئوتید بـه بـاکتری Enterococcus faecium سـویه‌هـای NR_114742.1، AY172570.1 و KP326370.1 مشـــابهت داشـــت و همچنین این ناحیه در باکتری سـویه‌ی B (KX185055) با ۹۹درصد مشابهت در طول ۱۴۷۷ نوکلئوتید سویه‌های LC035125.1، FJ378687.1 و KP326370.1 بـه بـاکتری Enterococcus faecium نزدیک بود (تصاویر شماره۴ و۵).

A)

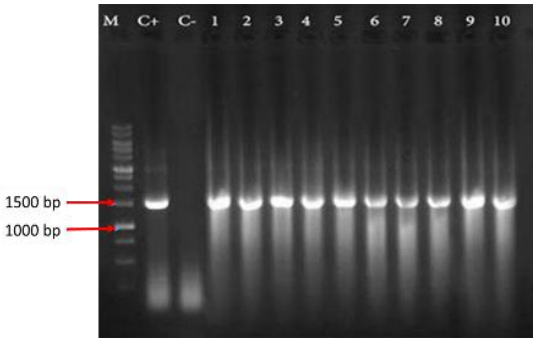
> Enterococcus faecium A (KX185054)

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATAC
ATGCAAGTCAAACGCTTCTTTTTCCACCGGAGCTTG
CTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAAAAGGGGATA
ACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATC
GAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGG
GTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGC
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAAACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACAAAAGTCTGAC
CGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAAAAGGTTTTCGGA
TCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA
GAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGG
CGTAAAGCGAGCGCCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAACCCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
TGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT
CTGTAACTGACGCTGAGGCTAGAAAGCGTGGGGAG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCT
TCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTG
GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCC
CTTCGGGGGCAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT
CAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
GAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGC
TAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGC
TGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT
GTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGC
CAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAA
GTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCT
GGATCA

تصـویر شـماره ۳: تـوالی ناحیـه 16S rRNA در بـاکتری سـویه‌ی KX185054 به طول ۱۵۳۵ bp جداسازی شده از شیره‌ی بلوط.



تصویر شماره ۴: استخراج DNA ژنومی از بـاکتری‌هـای انتروکوکوس. چاهک M: نشانگر 1Kb، چاهک‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به نمونـه‌هـایی از DNA ژنومی (۱۰µg/µl) تعداد ۱۰ کلنی از باکتری‌ها است.



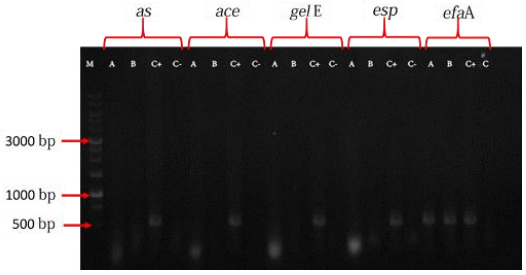
تصویر شماره ۵: تکثیر ناحیه‌ی 16S rRNA با استفاده از آغازگرهـای عمـومی. M: نشـانگر 1Kb، C^-: کنتـرل منفـی، C^+: بـاکتری E. coli، چاهک‌های ۱ تـا ۱۰ محصـول PCR مربـوط بـه تعـداد ۱۰ کلنـی از باکتری‌های انتروکوکوس فاسیوم. همان‌طور که مشـاهده مـی‌شـود، باند مربوط به تکثیر ناحیه rRNA با اندازه مورد نظر (۱۵۰۰ bp) هم-خوانی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

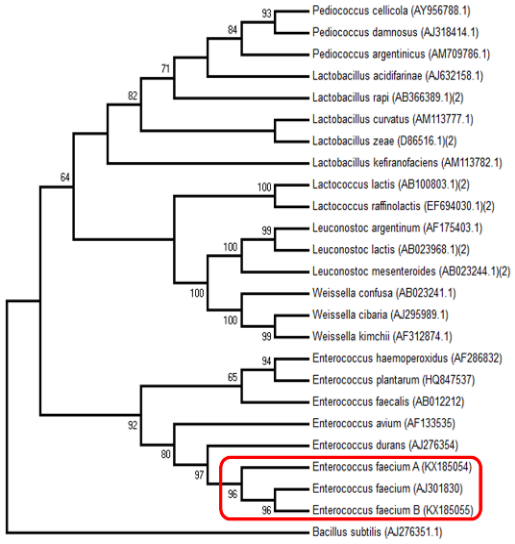
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جداسازی شده از شیره‌ی بلوط نشان داد که هر دو سویه به طیفی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند. سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، کوتریموکسازول، اریترومایسین، سفوتاکسیم، آزیترومایسین، سفتریاکسون مقاوم بودند. بیش‌ترین میزان حساسیت مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و نیتروفورانتوئین بود. از میان دو سویه‌ی مورد آزمایش سویه Enterococcus faecium A (KX185055) به کربنسیلین حساس و سویه Enterococcus faecium B (KX185055) به تری‌متوپریم حساس بودند. هر دو سویه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین و پنی‌سیلین نیز حساسیت نشان دادند. در آزمون شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی، هر دو سویه‌ی انتروکوکوس فاسیوم A و B تنها دارای ژن efaA بودند (تصویر شماره ۶). همانطور که در تصویر شماره ۶ مشاهده می‌شود، هر دو سویه فاقد سایر ژن‌های بیماری‌زایی هستند.



تصویر شماره ۶: الکتروفورز محصول ژن‌های بیماری‌زایی در سویه‌های Enterococcus faecium A (KX185054) و Enterococcus faecium B (KX185055) جداسازی شده از شیره‌ی بلوط به کمک تکنیک PCR تخصصی. اندازه محصول PCR ژن efaA (۴۹۹bp) می‌باشد.

تصویر شماره ۷، درخت فیلوژنی مربوط به باکتری اسیدلاکتیک به همراه دو سویه‌ی A و B این مطالعه را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود توالی تقریباً کامل ناحیه‌ی 16S rRNA جدایه‌های حاصل از شیره‌ی بلوط با نمونه‌های منتخب از جنس انتروکوکوس قرابت نزدیک‌تری را نشان می‌دهند.



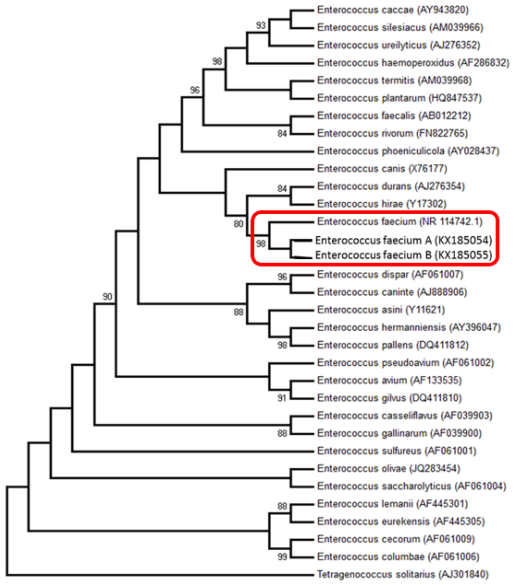
تصویر شماره ۷: درخت فیلوژنی با روش حداکثر تطابق بر اساس توالی ناحیه 16S rRNA از گونه‌های مختلف جنس‌های اسید لاکتیک. از باکتری Bacillus subitilis به‌عنوان برون گروه برای ریشه‌دار نمودن درخت استفاده شد. اعداد روی شاخه‌ها مقادیر بوت استرپ با تعداد تکرار ۱۰۰۰ را نشان می‌دهند. کد دسترسی سویه‌ها در داخل پرانتز نمایش داده شد.

در ادامه برای اطمینان بیش‌تر و تأیید تشخیص موقعیت فیلوژنتیک جدایه‌ها در سطح گونه، مراحل تعیین بهترین هم‌ردیفی، ترسیم درخت فیلوژنی برای جدایه‌های حاصل از شیره‌ی بلوط و گونه‌های جنس انتروکوکوس انجام گرفت. موقعیت فیلوژنتیکی ژن‌های 16S rRNA جدایه‌های حاصل از شیره‌ی بلوط نزدیکی تکاملی بسیار زیادی به گونه‌های انتروکوکوس فاسیوم را نشان دادند (تصویر شماره ۸). همان طور که ملاحظه می‌شود، دو سویه‌ی A و B این مطالعه در کلاد مربوط به باکتری انتروکوکوس قرار گرفته‌اند و اعتبار آماری این درخت در شاخه‌های مربوط به کلاد انتروکوکوس‌ها ۹۸ درصد می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017



تصویر شماره ۸: درخت فیلوژنی با روش حداکثر تطابق بر اساس توالی ناحیه 16S rRNA از گونه‌های مختلف جنس انتروکوکوس. از باکتری Tetragenococcus solitarius به‌عنوان برون گروه برای ریشه‌دار نمودن درخت استفاده شد. اعداد روی شاخه‌ها مقادیر بوت استرپ با تعداد تکرار ۱۰۰۰ را نشان می‌دهند. کد دسترسی سویه‌ها در داخل پرانتز نمایش داده شده‌اند.

بحث

باکتری‌های اسیدلاکتیک اولین بار از شیر جداسازی شده‌اند و به صورت گسترده از آن‌ها به عنوان کشت آغازگر در صنایع لبنی، گوشت، سبزی‌ها و غلات استفاده شده است(۳۴). هنوز هم منابع با ارزشی در طبیعت برای جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارد که باید مورد مطالعه قرار گیرند. اهمیت باکتری اسیدلاکتیک و عرضه محصولات حاوی باکتری‌های پروبیوتیک به بازار نیاز به شناسایی سویه‌های جدیدی از باکتری‌های مفید را دو چندان کرده است. مصرف این باکتری‌ها می‌تواند سلامت دستگاه گوارش را بهبود بخشیده و سیستم ایمنی را تقویت کند(۳۵). امروزه استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک و متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها در پیشگیری از فساد فرآورده‌های غذایی و افزایش زمان ماندگاری به ویژه در فرآورده‌های غنی از مواد مغذی و ویتامین‌ها بسیار رایج شده است. همچنین، با افزایش مقاومت پادزیستی و عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی، استفاده از درمان‌های طبیعی جایگزین، ضروری به نظر می‌رسد(۳۶). نتایج این مطالعه نشان داد که همه ۵۳۴ کلنی قادر به رشد در دماهای مختلف بودند، اما در دمای $37^{o}C$ رشد بهتری داشتند و کلنی‌ها در این دما، رشد بیشتری نشان دادند. کشت مجدد کلنی‌های حاصل از کشت در دماهای ۱۵، ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد در دمای $37^{o}C$، سبب افزایش رشد و اندازه کلنی‌ها شد. جکسون و همکاران (۲۰۰۵) با بررسی اثر دما و pH محیط کشت بر رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک نشان دادند که تغییر در درجه حرارت محیط کشت باعث کاهش رشد برخی از نمونه‌های باکتریایی موجود در آب و محصولات لبنی می‌شود(۳۷). تشخیص دقیق گونه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک و از آن جمله باکتری‌های جنس انتروکوکوس تولیدکننده‌ی پپتیدهای ضدمیکروبی جهت ارائه سویه‌های مناسب به‌عنوان عوامل پروبیوتیک و نگهدارنده‌های زیستی مواد غذایی ضروری می‌باشد. در حال حاضر، یکی از روش‌های استاندارد جهت شناسایی انتروکوک‌ها، تشخیص بر پایه خصوصیات ظاهری با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی می‌باشد(۳۹،۳۸). در این روش، سویه‌ها براساس رشد در محیط‌های مختلف، واکنش‌های بیوشیمیایی، حرکت، تخمیر قندها و تولید پیگمان طبقه‌بندی می‌شوند(۴۰). اگر چه بیش از ۲۰ گونه انتروکوک با استفاده از این روش‌ها قابل شناسایی هستند، اما این قبیل آزمون‌ها عموما در لوله آزمایش انجام می‌شوند و به مدت زمان طولانی جهت گرماگذاری و متعاقبا تفسیر نتایج نیاز دارند(۴۲،۴۱). نتایج بررسی‌های مورفولوژیکی، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی این مطالعه نشان داد که باکتری‌های به شکل کوکسی، کاتالاز منفی، گرم مثبت هستند که مشخصه‌ی اصلی باکتری‌های اسیدلاکتیک را نشان می‌دهند(۴۴،۴۳). محققان از نتایج حاصل از تخمیر قندها و آزمون حرکت باکتری برای تشخیص باکتری‌ها در سطح گونه استفاده می‌کنند(۱۱). نتایج این بخش از مطالعات نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

باکتری‌ها به جنس *انتروکوکوس* تعلق دارند. با این حال، آزمایش‌های مولکولی نشان داد که گونه‌های این باکتری احتمالاً *فاسیوم* هستند که با گونه‌های شناخته شده از طریق آزمون‌های بیوشیمیایی مطابقت داشت. آزمون‌های بیوشیمیایی خاص مانند تخمیر قندها، آزمون اکسیداسیون یا تخمیر گلوکز (O/F) و آزمون حرکت از جمله آزمون‌هایی هستند که می‌توان از آن‌ها برای شناسایی گونه‌های مختلف باکتری‌های جنس *استرپتوکوکوس* و *انتروکوکوس* استفاده نمود(۴۴). با انجام این آزمایش‌ها علاوه بر شناسایی باکتری‌ها در سطح گونه، می‌توان نتایج قبلی این پژوهش را نیز تأیید کرد. نتایج حاصل از تخمیر قندها که مهم‌ترین آزمون بیوشیمیایی باکتری‌ها در سطح گونه می‌باشد، نشان داد که تمامی باکتری‌های جنس *انتروکوکوس* قادر به تخمیر قندهای گلوکز، ساکارز، سوربیتول، ترهالوز، فروکتوز، گالاکتوز، آرابینوز، مانیتول و لاکتوز هستند، اما توانایی تخمیر قندهای رافینوز، زایلوز، ملی‌بیوز را نداشتند. با مقایسه‌ی الگوی تخمیری قندها در مطالعه حاضر و نتایج به دست آمده در مطالعات مانرو و بلانچ (۱۹۹۹)، مشخص شد که باکتری‌های جنس *انتروکوکوس* به گونه *فاسیوم* تعلق دارند. نتایج حاصل از کار مانرو و بلانچ نشان داد که باکتری‌های *انتروکوکوس فاسیوم* گرم مثبت، کاتالاز منفی هستند که توانایی رشد در دماهای ۴، ۱۰، ۴۵، ۵۰ و همچنین رشد در pH= ۹/۶ و غلظت بالای نمک کلرید سدیم را دارند. در رابطه با تخمیر قندها بر اساس نتایج این دو محقق، مهم‌ترین قندهایی که باعث ایجاد تفاوت بین گونه‌ی *فاسیوم* و سایر گونه‌های جنس *انتروکوکوس* به خصوص *انتروکوکوس فکالیس* (نزدیک‌ترین گونه به *فاسیوم*) می‌شود، قندهایی چون سوربیتول، ملی‌بیوز، آرابینوز، رافینوز هستند(۱۱). شناسایی فنوتیپی باکتری‌های اسیدلاکتیک بیش‌تر براساس مورفولوژی سلولی و تفاوت در سوبستراهای کربوهیدراتی انجام می‌شود، اما در روش‌های شناسایی فنوتیپی عدم تکرارپذیری نتایج در همه آزمایشگاه‌ها مشکل‌ساز می‌باشد، زیرا علاوه بر متفاوت بودن شرایط کشت در هر آزمایشگاه، تنوع گونه‌ها نیز زیاد می‌باشد(۴۵). بنابراین شناسایی دقیق‌تر باید توسط روش‌های مولکولی انجام بگیرد تا با قدرت و دقت بهتری سویه‌ها تشخیص داده شوند(۴۶). تکنیک‌های شناسایی باکتری‌ها مبتنی بر توالی‌یابی DNA یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین روش‌های شناسایی مولکولی باکتری‌ها می‌باشد. به دلیل گستردگی و سختی توالی‌یابی تمام طول ژنوم باکتری عموماً از توالی‌یابی ژن‌های خانه‌دار استفاده می‌شود که توالی‌شان در طول زمان تغییر زیادی نمی‌کنند(۴۷). برای تشخیص باکتری‌های جنس انتروکوکوس همانند سایر جنس‌های باکتریایی از توالی ناحیه‌ی 16S rRNA استفاده می‌شود(۴۸). در این مطالعه پس از استخراج DNA ژنومی از باکتری‌ها، ناحیه‌ی 16S rRNA ی آن‌ها با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای عمومی تکثیر شد. پس از تعیین توالی ناحیه 16S rRNA باکتری‌ها، توالی‌یابی به‌صورت دوطرفه انجام شد، بدین‌صورت که از هر طرف محصول PCR تا حداکثر 1 Kb توالی‌یابی شد. تعیین بهترین هم‌ردیفی بین توالی 16S rRNA و توالی‌های 16S rRNA موجود در پایگاه‌های داده در صورتی که بین دو توالی شباهت (همولوژی) بیشتر از ۹۹ درصد باشد شناسایی در سطح گونه و سویه مقدور می‌باشد و اگر شباهت بین ۹۷ تا ۹۹ درصد باشد شناسایی در سطح گونه انجام می‌شود(۴۹). با توجه به هم‌پوشانی نوکلئوتیدهای مربوط به توالی باکتری‌های حاصل از شیره‌ی بلوط این مطالعه با توالی ناحیه 16S rRNA باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* موجود در پایگاه NCBI، میزان تطابق ۹۹ درصد برآورد شد. برای تشخیص موقعیت فیلوژنتیک جدایه‌های این مطالعه در سطح جنس، توالی‌های ژن 16SrRNA باکتری‌های *انتروکوکوس* این مطالعه همراه با توالی‌های ژن 16rRNAS ی گونه‌های سایر جنس‌های اسیدلاکتیک با استفاده از نرم‌افزارهای Clustal W هم‌ردیف شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

همانطور که مشاهده می‌شود، توالی تقریباً کامل ناحیه‌ی 16S rRNA جدایه‌های حاصل از شیره‌ی بلوط با نمونه‌های منتخب از جنس *انتروکوکوس* قرابت نزدیک‌تری را نشان می‌دهند که نشان‌دهنده این است که این گونه‌ها متعلق به جنس *انتروکوکوس* هستند. همچنین در درخت فیلوژنی حاصل، گونه‌های وابسته به یک جنس در کلادهای مربوطه قرار گرفتند. همچنین رسم درخت فیلوژنی باکتری‌ها و مقایسه‌ی این درخت با درخت ایجاد شده توسط محققان دیگر نشان می‌دهد که درخت حاصل از صحت کافی برخوردار است(۵۰). باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی و میکروآئروفیلیک هستند که قادر به تولید هاگ نمی‌باشند(۳۸). دوام باکتری‌های جنس انتروکوکوس به محدوده وسیع رشد دمایی ^{o}C ۴۵-۱۰، دامنه‌ی تحمل اسیدیته‌ی محیط (pH=۴ -۹/۶) و تحمل نمک (با غلظت ۶/۵ درصد NaCl) نسبت داده می‌شود(۵۱). انتروکوکوس فکالیس، انتروکوکوس فاسیوم و انتروکوکوس دورانس گونه‌هایی هستند که بیش‌ترین فراوانی را در بین سایر گونه‌های جنس انتروکوکوس به خود اختصاص داده‌اند و در محصولات لبنی به فراوانی یافت می‌شوند(۵۲). در این مطالعه روش‌های غربال‌گری از جمله رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کاتالاز، آزمون تحمل نمک طعام، رشد در دماهای مختلف، رشد در pH=۴/۴ و pH=۹/۶ و بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که ۵۶/۱ درصداز کل کلنی‌ها کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند که مشخصه‌ی اصلی باکتری‌های اسیدلاکتیک است. اگرچه این قبیل آزمون‌ها کمک مؤثری به شناسایی جنس و گونه‌های مختلف باکتری می‌کنند، اما در بیشتر موارد قادر به تشخیص سویه باکتری‌ها نیستند. شناسایی دقیق‌تر با استفاده از توالی‌یابی 16S rRNA صورت گرفت،که پس از استخراج DNA ژنومی ناحیه‌ی 16S rRNA‌ی آن‌ها با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای عمومی تکثیر شد. مقایسه توالی ناحیه 16S rRNA باکتری‌های این مطالعه با توالی‌های پایگاه NCBI و با استفاده از نرم‌افزار BLAST نشان داد که بهترین انطباق با توالی ژن 16S rRNA ی متعلق به باکتری انتروکوکوس فاسیوم با ۹۹ درصد همپوشانی اتفاق افتاد. توالی 16S rRNA مربوط به باکتری‌های انتروکوکوس فاسیوم این مطالعه به صورت سویه‌های جدیدی به نام‌های Enterococcus faecium B و Enterococcus faecium A به ترتیب به شماره‌های دسترسی KX185055 و KX185054 در پایگاه NCBI ثبت گردیدند. نتیجه توالی‌یابی 16S rRNA سویه‌های جدا شده از شیره‌ی بلوط با نتایج به دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی کاملا مطابقت داشتند. همانند نتایج(۵۳)، توالی‌یابی ناحیه‌ی 16S rRNA به خوبی توانست دو سویه‌ی A و B را از هم تمیز دهد. اگرچه این دو سویه در بیشتر موارد آزمون‌ها رفتار یکسانی از خود نشان دادند، اما آزمون‌های حساسیت به آنتی‌بیوتیک و تولید گاز از گلوکز و رشد در pH=۴/۴ تفاوت‌هایی را نشان دادند. انتروکوکوس کاربردهای مهمی در صنعت لبنیات دارد و در تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی در طی رسیدن بسیاری از پنیرها نقش ایفا می‌کنند. هم‌چنین از آن به عنوان مؤلفه اصلی در محیط کشت استارتر استفاده می‌شود(۹). برای تأیید این مسأله، بسیاری از محققان ادعا نموده‌اند که انتروکوکوس‌ها می‌توانند دارای فعالیت‌های پروتئولیتیکی و لیپولیتیکی باشند(۵۴). با افزایش روز افزون مقاومت دارویی در انتروکوک‌ها، اهمیت بررسی فاکتورهای مرتبط با کلونیزاسیون و پاتوژنز این باکتری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. پروتئین‌هایی همچون همولیزین، ژلاتیناز و فاکتور تجمعی (Agglutination Substance)، در سیستم‌های تبادل پلاسمیدی شرکت می‌جویند. این پروتئین‌ها به همراه سایر فاکتورها در بیماری‌زایی انتروکوک‌ها شرکت دارند، هر چند نقش دقیق آن‌ها در عفونت‌زایی نامشخص باقی مانده است(۵۵). سویه‌ای از انتروکوکوس به نام E. faecium SF68 به‌عنوان پروبیوتیک در سوئیس استفاده شده که اثر کلینیکی مؤثری در جلوگیری از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

اسهال دارد و در فرآیند درمان اسهال در کودکان مؤثر شناخته شده است. اخیرا کمیته نظارت بر مواد غذایی در انگلیس استفاده از سویه E. faecium K77D را به‌عنوان استارتر محصولات لبنی تخمیری تأیید نموده است(۵۶). به‌علاوه تفاوت در برخی ویژگی‌های تکنولوژیکی (به ویژه فعالیت پروتئولیتیکی) می‌تواند منجر به انتخاب سویه‌های ویژه شده و بنابراین در کنار باکتری‌های اسیدلاکتیک به عنوان استارتر استفاده شوند(۵۷). عدم وجود فاکتورهای بیماری‌زایی و واگیر در سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم این مطالعه نشان می‌دهد که آن‌ها می‌توانند به عنوان استارترهای غیر سنتی برای ایجاد خصوصیات ارگانولپتیک و تضمین سلامت استفاده شوند(۵۸).

سپاسگزاری

از سرکارخانم نوروزی کارشناس آزمایشگاه بیوتکنولوژی و سرکارخانم شاکرمی کارشناس تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی نهایت تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. این مطالعه با استفاده از گرنت پژوهشی دانشگاه لرستان صورت گرفته است.

References

1. Stanton C, Gardiner G, Meehan H, Collins K, Fitzgerald G, Lynch PB, et al. Market potential for probiotics. Am J Clin Nutr 2001; 73(suppl 2): 476s-483s.
2. Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. Gut 2001; 48(1): 132-135.
3. Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GD, Hirschfield GM, Hold G, et al. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. Gut 2016; 65(2): 330-239.
4. Kopp-Hoolihan L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. J Am Diet Assoc 2001; 101(2): 229-241.
5. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. Am J Clin Nutr 2001; 73(Suppl 2): 361s-364s.
6. Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. J Nutr 2000; 130(2 Suppl): 415S-416S.
7. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. Emerg Infect Dis 1998; 4(2): 239-249.
8. Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. Int J Food Microbiol 2003; 88(2-3): 215-222.
9. Giraffa G. Enterococci from foods. FEMS Microbiol Rev 2002; 26(2): 163-171.
10. Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Laufs R, Claussen M, Wirth R. Virulence factors of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium blood culture isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19(1): 39-42.
11. Manero A, Blanch AR. Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Appl Environ Microbiol 1999; 65(10): 4425-4430.
12. Sava IG, Heikens E, Huebner J. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Clin Microbiol Infect 2010; 16(6): 533-540.
13. Caridi A. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. Int J Dairy Technol 2003; 56(2): 105-110.
14. Van Merode AE, van der Mei HC, Busscher HJ, Krom BP. Influence of culture heterogeneity in cell surface charge on adhesion and

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

biofilm formation by Enterococcus faecalis. J Bacteriol 2006; 188(7): 2421-2426.

15. Berahou A, Auhmani A, Fdil N, Benharref A, Jana M, Gadhi C. Antibacterial activity of Quercus ilex bark's extracts. J Ethnopharmacol 2007; 112(3): 426-429.
16. Mehrnia M, Nejadsattari T, Assadi M, Mehregan I. Taxonomic study of the genus quercus l. Sect. Quercus in the zagros forests of iran. Iran J Bot 2013; 19(1): 62-74.
17. Johnson P, Shifley S, Rogers R. Even-aged silvicultural methods: The Ecology and Silviculture of Oaks 2002; 254-334.
18. Merkle SA, Nairn CJ. Hardwood tree biotechnology. In Vitro Cell Dev Biol-Pl 2005; 41(5): 602-619.
19. Irisawa T, Okada S. Lactobacillus sucicola sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from oak tree (Quercus sp.) sap. Int J Syst Evol Microbiol 2009; 59(11): 2662-2665.
20. Irisawa T, Oshima K, Suda W, Kitahara M, Sakamoto M, Kitamura K, et al. Draft genome sequence of Lactobacillus sucicola JCM 15457T, a motile lactic acid bacterium isolated from oak sap. Genome Announc 2014; 2(3): e00403-14.
21. Alfonzo A, Ventimiglia G, Corona O, Di Gerlando R, Gaglio R, Francesca N, et al. Diversity and technological potential of lactic acid bacteria of wheat flours. Food Microbiol 2013; 36(2): 343-354.
22. Kawasaki S, Kurosawa K, Miyazaki M, Yagi C, Kitajima Y, Tanaka S, et al. Lactobacillus floricola sp. nov., lactic acid bacteria isolated from mountain flowers. Int J Syst Evol Microbiol 2011; 61(pt 6): 1356-1359.
23. Tohno M, Kitahara M, Irisawa T, Inoue H, Uegaki R, Ohkuma M, et al. Lactobacillusoryzae sp. nov., isolated from fermented rice grain (Oryza sativa L. subsp. japonica). Int J Syst Evol Microbiol 2013; 63(8): 2957-2962.
24. Tohno M, Kitahara M, Uegaki R, Irisawa T, Ohkuma M, Tajima K. Lactobacillushokkaidonensis sp. nov., isolated from subarctic timothy grass (Phleum pratense L.) silage. Int J Syst Evol Microb 2013; 63(7): 2526-2531.
25. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock biología de los microorganismos. 2004.
26. Clarke PH, Cowan ST. Biochemical methods for bacteriology. J Gen Microbiol 1952; 6(1-2): 187-197.
27. Akabanda F, Owusu-Kwarteng J, Glover R, Tano-Debrah K. Microbiological characteristics of Ghanaian traditional fermented milk product, Nunu. Nature and Science. 2010; 8(9): 178-187. 11 (Placeholder1).
28. Das S, Dash HR. Basic Molecular Microbiology of Bacteria. Microbial Biotechnology-A Laboratory Manual for Bacterial Systems: Springer; 2015. p. 1-34.
29. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol 1991; 173(2): 697-703.
30. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary gEffect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens. Effect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens. Inetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 2013; 30(12): 2725-2729.
31. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 1985: 783-791.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

32. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates collected in Sardinia (Italy). J Med Microb 2003; 52(6): 491-498.
33. Glauert AM, Reid N. Fixation, dehydration and embedding of biological specimens. North Holland: 1975.
34. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. New York: Marcel Dekker, Inc; 2004. p. 1-66.
35. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KA , Tsakalidou E, Nychas GJ, Panagou EZ, et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiol 2013; 33(2): 282-291.
36. De Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr 2000; 71(2): 405-411.
37. Jackson C, Fedorka- Cray P, Jackson- Hall M, Hiott L. Effect of media, temperature and culture conditions on the species population and antibiotic resistance of enterococci from broiler chickens. Lett Appl *Microbiol* 2005; 41(3): 262-268.
38. Alvarez-Sieiro P, Montalbán-López M, Mu D, Kuipers OP. Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. Appl Microbiol Biotechnol 2016; 100(7): 2939-2951.
39. Rosa RG, Schwarzbold AV, Santos RPd, Turra EE, Machado DP, Goldani LZ. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteremia in a tertiary care hospital: Epidemiology, antimicrobial susceptibility, and outcome. Biomed Res Int 2014; 2014.958469.
40. Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. Use of a genus-and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J Clin Microb 2004; 42(8): 3558-3565.
41. Facklam RR, Collins MD. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. J Clin Microb 1989; 27(4): 731-734.
42. Facklam RR, Maria da Gloria SC, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. American Society Microbiology: 2002.
43. Kenzaka T, Tani K. Scanning electron microscopy imaging of bacteria based on nucleic acid sequences: Open Access Pub; 2012.
44. Kersters K, Vancanneyt M. Bergey's manual of systematic bacteriology. NewYork: Springer Verlag; 2005.
45. Nigatu A, Ahrné S, Molin G. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles for the distinction of Lactobacillus species. Antonie Van Leeuwenhoek 2001; 79(1): 1-6.
46. Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. Lait 2003; 83(4): 269-306.
47. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. J Clin Microb 2003; 41(4): 1447-1453.
48. Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP. A rapid PCR based method to distinguish between Lactococcus and Enterococcus. Syst Appl Microbiol 2000; 23(4): 510-522.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 9:49 +0430 on Wednesday May 31st 2017

49. Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral J-P, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol 2000; 38(10): 3623-2630.
50. Pang H, Tan Z, Qin G, Wang Y, Li Z, Jin Q, et al. Phenotypic and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from forage crops and grasses in the Tibetan Plateau. J Microbiol 2012; 50(1): 63-71.
51. Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. Int J Food Microb 2008; 126(3): 291-301.
52. Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. Int Dairy J 2006; 16(8): 867-875.
53. Akrami MJ, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A, Bagheri Sheshdeh M. Isolation and identification of probiotic lactic acid bacteria from donkey milk. Yafte 2015; 17(4): 99-108.
54. Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. Appl Environ Microb 2001; 67(9): 4385-4389.
55. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. J Infect Dis 1995; 171(5): 1223-1229.
56. Foulquie Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. Int J Food Microb 2006; 106(1): 1-24.
57. Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni M, et al. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). J Appl Microbiol 2000; 89(2): 267-274.
58. Saavedra L, Sesma F, de Valdez GF. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic Enterococcus faecium strains. Int J Food Microbiol 2003; 88(2-3): 241-245.

www.SID.ir