

Effect of Genetically Modified Rice on Some Intestinal Microbial Flora in Rats

Bahador Hajimohammadi¹,
Gilda Eslami²,
Hengameh Zandi³,
Saeedeh Sadat Hosseini⁴,
Mehmoosh Shirdeli⁵,
Elahé Loni⁵,
Salman Ahmadian⁶,
Vahideh Askari⁷,
Maryam Sheykhzadegan⁴,
Raziyeh Barzegar-bafroui⁵,
Hossein Fallahzadeh⁸,
Mahmoud Vakili⁹

¹ Associate Professor, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

² Associate Professor, Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

³ Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁴ MSc in Medical Microbiology, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁵ MSc in Food Hygiene and Safety, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁶ MSc in Parasitology, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁷ MSc in Immunology, Research Center for Food Hygiene and Safety, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁸ Professor, Department of Biostatistics and Epidemiology, Faculty of Public Health, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

⁹ Associate Professor, Department of Community and Preventive Medicine, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

(Received November 7, 2021; Accepted June 27, 2022)

Abstract

Background and purpose: Transgenic rice is a type of rice that its genetic sequence has been changed to improve its quantity and quality. Bt (*Bacillus thuringiensis*) transgenic rice expresses Cry1Ab protein and is named Tarom Molaii. There are no studies on the effect of this type of transgenic rice on gastrointestinal health in Iran, so, this study investigated the effect of Tarom Molaii transgenic rice on common microbial flora of rat intestine.

Materials and methods: In this experimental study, 24 Sprague Dawley (SD) rats received transgenic and non-transgenic rice in their diets for 90 days and were compared with the control group that received standard rat diet. The number of *Escherichia coli*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Enterococcus* bacteria and the total number of aerobic and anaerobic bacteria in fecal samples were examined in jejunum, ileum, and duodenum samples on days 60, 90, and after killing the rats.

Results: The study showed that except for the total number of anaerobic bacteria in the stool sample on day 90, there was no significant relationship between the study groups and the number of bacteria ($P>0.05$). There was an increase in the number of intestinal *Lactobacillus* in the transgenic rice-fed group and a decrease in the number of anaerobic bacteria in the transgenic rice-fed group compared with the control group and the non-transgenic rice-fed group.

Conclusion: Consumption of transgenic rice in current study had no considerable effect on the number of common bacteria in the intestinal normal flora. But, long-term studies are needed in other laboratory animals.

Keywords: Tarom Molaii, transgenic rice, intestinal microbial flora, anaerobic bacteria, aerobic bacteria

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (211): 13-24 (Persian).

Corresponding Author: Hengameh Zandi - Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
(E-mail: hengameh_zandi@yahoo.com)

تاثیر مصرف برنج تراریخته طارم مولایی بر برخی از باکتری‌های فلور میکروبی روده رت

بهادر حاجی محمدی¹

گیلدا اسلامی²

هنگامه زندی³

سعیده سادات حسینی⁴

مهرنوش شیردلی⁵

الهه لونی⁵

سلمان احمدیان⁶

وحیده عسکری⁷

مریم شیخ زادگان⁴

رضیه برزگر بفرولی⁵

حسین فلاح زاده⁸

محمود وکیلی⁹

چکیده

سابقه و هدف: برنج تراریخته، برنجی است که با هدف ایجاد ویژگی جدید، در توالی آن تغییراتی ایجاد شده است. برنج تراریخته *Bt* (*Bacillus thuringiensis*) با عنوان طارم مولایی بیان‌کننده پروتئین Cry1Ab است. با توجه به عدم وجود مطالعه در راستای تاثیر برنج تراریخته طارم مولایی بر سلامت دستگاه گوارش و اهمیت این موضوع، در این مطالعه به بررسی تاثیر مصرف برنج تراریخته طارم مولایی بر فلور میکروبی روده رت پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مداخله‌ای - تجربی تعداد 24 رت از نژاد SD (Sprague Dawley) تحت رژیم غذایی برنج تراریخته و غیرتراریخته به مدت 90 روز قرار گرفتند و با گروه کنترل (غذای استاندارد رت) مقایسه شدند. تعداد باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *بیفیدوباکتریوم*، *لاکتوباسیلوس*، *انتروکوکوس* و تعداد کل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی در نمونه‌های مدفوع روز 60 و 90 و همچنین پس از کشته شدن رت‌ها، در نمونه‌های ژنوم، ایلنوم و دئودنوم بررسی شدند.

یافته‌ها: در این مطالعه، به جز تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی در نمونه مدفوع روز 90، بین گروه‌های مورد مطالعه و تعداد انواع باکتری‌های مورد بررسی ارتباط معنی‌داری وجود نداشت ($P > 0/05$) و افزایش در تعداد *لاکتوباسیلوس* روده گروه تغذیه شده با برنج تراریخته و کاهش در تعداد باکتری‌های بی‌هوازی گروه تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با گروه کنترل و گروه تغذیه شده با برنج غیرتراریخته دیده شد.

استنتاج: اگرچه در مطالعه حاضر مصرف برنج تراریخته بر تعداد باکتری‌های شایع فلور روده تاثیر مشهودی نداشت، اما برای ارزیابی جامع در این زمینه نیاز به انجام مطالعات بلند مدت در سایر حیوانات آزمایشگاهی است.

واژه‌های کلیدی: برنج تراریخته، طارم مولایی، فلور میکروبی روده، باکتری‌های بی‌هوازی، باکتری‌های هوازی

مقدمه

گیاهان تراریخته یا اصلاح ژنتیک شده (Genetically Modified Plants)، انواعی از گیاهان هستند که با اهداف بهینه‌سازی محصول و ایجاد صفات مطلوب از طریق علم مهندسی ژنتیک کشاورزی و افزودن

E-mail: hengameh_zandi@yahoo.com

مؤلف مسئول: هنگامه زندی - یزد: دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، دانشکده پزشکی

1. دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

2. دانشیار، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

3. دانشیار، گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

4. فوق لیسانس میکروبی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

5. فوق لیسانس بهداشت و ایمنی مواد غذایی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

6. فوق لیسانس انگل شناسی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

7. فوق لیسانس ایمنی شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

8. استاد، گروه آمار و اپیدمیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

9. دانشیار، گروه پزشکی اجتماعی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

تاریخ دریافت: 1400/8/16 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/9/28 تاریخ تصویب: 1401/4/5

ژن‌هایی خاص، در توالی ژنتیک آن‌ها تولید می‌شوند. این اهداف عمدتاً شامل افزایش بازدهی اقتصادی تولید محصول، مقاومت به علف‌کش‌ها، مقاومت به آفات و کاهش استفاده از سموم شیمیایی سنتتیک در مزارع کشاورزی است (1-3).

برنج (*Oryza sativa* L.) پس از ذرت دومین محصول کشاورزی پرتولید در جهان است (4) و منحصراً به منظور مصرف انسان کشت می‌شود. این گیاه، قوت غالب بیش از 3/5 میلیارد نفر در جهان می‌باشد که حدود نیمی از جمعیت کنونی دنیا را تشکیل می‌دهند و در بیش از یکصد کشور دنیا مصرف می‌شود. حدود 21 درصد از سرانه جهانی انرژی مورد نیاز جوامع انسانی از برنج تامین می‌شود که این رقم در کشورهای در حال توسعه بالاتر است (5). بدیهی است که در عصر حاضر تامین مقادیر کافی برنج مورد نیاز این جمعیت در حال رشد، با استفاده صرف از روش‌های سنتی میسر نبوده و به کارگیری دانش و فناوری‌های نوین به منظور حل این نیاز حیاتی اجتناب‌ناپذیر است. در طول دو دهه اخیر، دانشمندان انواع مختلف برنج تراریخته را با اهداف مختلف گوناگونی تولید کرده‌اند. اولین برنج تراریخته مقاوم به آفات به نام طارم مولایی (*Tarom Molaii cryIAb*) در کشور ایران تولید شده که در مقابل کرم ساقه خوار (*Chilo suppressalis*) مقاوم است (6) و از شاخص‌ترین انواع برنج تراریخته Bt مقاوم به آفات محسوب می‌شود که دارای ژن *cry* است و این ژن از باکتری گرم مثبت *Bacillus thuringiensis* گرفته شده است. پس از بیان ژن *cry*، پروتئین کریستالی Bt (*Bacillus thuringiensis*) تولید می‌شود که برای بسیاری از حشرات و آفات برنج سمی بوده و از این طریق راندمان تولید محصول را ارتقا می‌دهد (۸۷). براساس مبانی سلامت غذا، تولید هر محصول جدید و ناشناخته نیازمند انجام مراحل ارزیابی ایمنی است. عموماً حصول ایمنی مواد غذایی مورد مصرف انسان بر پایه نظریه‌ای است که طبق آن باید اطمینان حاصل شود که هیچ ضرری در نتیجه مصرف عامدانه

آن غذا در شرایط طبیعی مصرف ایجاد نمی‌شود (9). ارتباط بین سلامت گوارش و بیماری‌های میزبان با مصرف برنج تراریخته موضوع برخی از مطالعات قرار گرفته است و تا کنون اطلاعات پراکنده‌ای از تاثیرات محصولات تراریخته بر سلامت گوارش در دست است. تعدادی از مطالعات ایمن بودن پروتئین Cry را به اثبات رسانده‌اند، زیرا این پروتئین گیرنده‌ای در سطح سلول‌های اپیتلیال پستانداران ندارد و همچنین ماهیت اسیدی معده سبب حذف این پروتئین در سیستم گوارش می‌شود، ولی گزارشاتی مبنی بر تاثیر CryIAb و اتصال آن به سطح سلول‌های موکوسی روده و تغییر عملکرد سلول‌های اپیتلیال وجود دارد (10).

با وجود این که روده اولین محل برخورد با باکتری‌ها و آنتی‌ژن‌های غذایی نبوده، اما یکی از بزرگ‌ترین محل‌های پاسخ‌های ایمنی در میزبان به شمار می‌رود و نقش مهمی در واکنش‌های متابولیک، جذب مواد غذایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی دارد (۱۱، ۱۲) و با وجود سیستم پیچیده‌ای که روده در سیستم گوارش دارد، تحت تاثیر فاکتورهای متفاوت از قبیل pH، محصولات متابولیک، ترکیب فلور روده، پاسخ‌های سیستم ایمنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ساختار اپیتلیالی قرار می‌گیرد (12). از این میان، ترکیب فلور میکروبی روده ممکن است فاکتور مهمی در پاتولوژی برخی بیماری‌ها از قبیل سرطان و یا التهاب روده باشد و می‌توان این نتیجه را گرفت که عدم وجود تعادل در میکروبیوتای روده با بیماری‌های متابولیک همراه بوده و از این رو مطالعه در جهت بررسی تاثیرات برنج تراریخته بر سلامت گوارش و بالخصوص ترکیب میکروبی روده از اهمیت به سزایی برخوردار است. لذا هدف اصلی این مطالعه بررسی تاثیر مصرف برنج تراریخته طارم مولایی بر باکتری‌های شایع فلور میکروبی روده رت بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه مداخله‌ای - تجربی، از 24 رت نر و

ماده با نژاد SD (Sprague Dawley) و با سن حدود 4 تا 5 هفته‌ای و وزن تقریبی 200 گرم استفاده شد. قبل از تهیه رت‌ها، قفس‌ها به صورت کامل با هیدروژن پراکساید 3 درصد ضد عفونی شدند. رت‌ها 5 روز قبل از آغاز آزمایش به منظور کاهش استرس و عادت به شرایط آزمایشگاهی در حیوانخانه نگهداری شدند. اتاق نگهداری حیوانات دارای رطوبت 40 تا 60 درصد و دمای 22 تا 25 درجه سانتی‌گراد بود. هم‌چنین سیکل نور به صورت 12 ساعت روشن و 12 ساعت خاموش تنظیم شد. هنگام کار با رت‌ها موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت شد و کلیه مراحل با تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با کد IR. SSU. SPH.REC. 1396.93 انجام شد. در این مطالعه 2 گروه تیمار بر حسب نوع برنج جیره (سنتی، تراریخته) و یک گروه شاهد (جیره استاندارد رت) وجود داشت. برنج‌ها از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تهیه شد. در هر گروه تیمار، مقدار 50 درصد جیره غذایی از برنج تشکیل شده بود. در هر گروه 4 رت نر و 4 رت ماده در نظر گرفته شد و رت‌ها به مدت 90 روز تغذیه شدند. رت‌ها به صورتی در هر گروه قرار داده شدند که میانگین وزن آن‌ها بین گروه‌های مختلف دارای اختلاف بیش از 20 درصد نباشد. شایان ذکر است کلیه آزمایشات به صورت دوسو کور (Double blind) انجام شد.

در طول دوره آزمایش، نمونه‌های تازه مدفوع (4 تا 5 گرم) در طی بازه‌های زمانی 60 و 90 روزه از 24 رت جمع‌آوری شد و در ظروف مخصوص مدفوع نگهداری شدند. همچنین در پایان دوره 90 روزه پس از بیهوشی و کشتن حیوانات از دئودنوم، ایلئوم و ژژنوم رت‌ها نمونه‌برداری انجام شد و در ظروف استریل به آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انتقال داده شدند. بیهوشی در حیوانات مطابق با دستورالعمل AVMA (13) با ترکیب کتامین-زایلازین (mg/mg) 10:1 صورت گرفت.

کشت نمونه‌ها، شمارش، جداسازی و تعیین هویت فنوتیپی ایزوله‌ها

نمونه‌های مدفوع و روده بلافاصله در محلول سدیم کلراید 0/9 درصد هموژنیزه شده و رقت‌های سریال (10^{-2} ، 10^{-1} ، 10^{-3}) در لوله حاوی سرم فیزیولوژی تهیه گردید. سپس از رقت‌های سریال بر روی محیط‌های کشت تلقیح شد. جهت کشت نمونه‌های دئودنوم، ایلئوم و ژژنوم نیز این قطعات با استفاده از پنس استریل برش داده شده و در محیط Trypticase Soy Broth (Conda، کانادا) قرار داده شده و بعد از هموژن کردن، رقت‌های سریال مورد نظر (10^{-2} ، 10^{-1} ، 10^{-3}) تهیه شد و به منظور شمارش و جداسازی باکتری‌های مهم روده (14) مانند اشریشیا کلی، انتروکوکوس، لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم به محیط‌های کشت مورد نظر تلقیح و به روش خطی کشت داده شد. جهت شمارش باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی رقت‌های سریال هر نمونه بر روی دو محیط RCA (Reinforced Clostridial Agar) (Quelab، انگلستان) کشت داده شد و یک پلیت در شرایط هوازی به مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد و پلیت دیگر در شرایط بی‌هوازی یعنی درون جار بی‌هوازی و استفاده از گاز پک بی‌هوازی (Merck، آلمان) به مدت حداقل 48-72 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. بعد از اتمام گرمخانه‌گذاری، کلنی‌های موجود در پلیت‌ها شمارش شده و با در نظر گرفتن رقت سریال به صورت CFU/ml گزارش شدند (15).

جهت جداسازی و شمارش جنس لاکتوباسیلوس، رقت‌های سریال هر نمونه بر روی محیط MRS (deMan, Rogosa, Sharpe agar) (diofilchem ایتالیا) تلقیح شده و به صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها درون جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک بی‌هوازی (Merck، آلمان) به مدت 48-72 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های رشد کرده به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت

کلنی‌های سیاه رنگ به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت تعیین هویت ایزوله‌های *انتروکوکوس* از آزمایش 6/5 درصد نمک نیز استفاده شد (19).

تعیین هویت مولکولی ایزوله‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم*

جهت استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها، از روش جوشاندن استفاده شد (20). سنجش کمی و کیفی DNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتری (Thermo، آمریکا) و ژل آگارز الکتروفورز (ژل آگارز 0/8 درصد) (فناوران سهند آذر، ایران) انجام شد.

جهت تکثیر ژن 16s rRNA *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس* از پرایمرهای زیر استفاده شد (21):

Bifidobacterium-F:
5'-CGCGTCYGGTGTGAAAG-3'

Bifidobacterium-R:
5'-CCCCACATCCAGCATCCA-3' (224 bp)

Lactobacillus-F:
5'-GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC-3'

Lactobacillus-R:
5'-GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC-3' (126 bp)

در واکنش PCR برای ژن‌های هدف، غلظت نهایی برای هر یک از مواد در حجم 20 میکرولیتر شامل 2/5 میکرولیتر آب مقطر تزریقی استریل، 2/5 میکرولیتر از پرایمر کار با غلظت 4 پیکومول / میکرولیتر، 10 میکرولیتر از Mastermix (Amplicon، دانمارک) و 5 میکرولیتر از DNA استخراج شده بود.

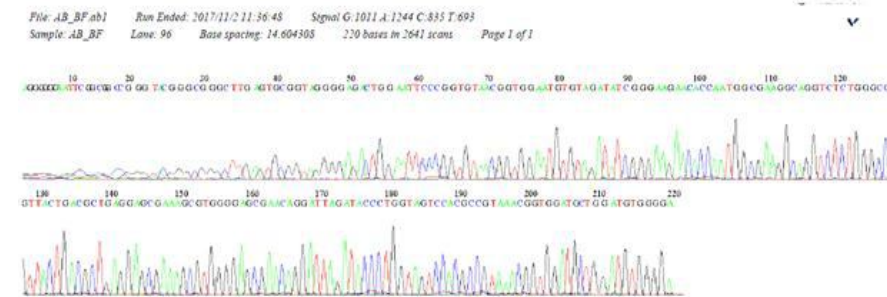
برنامه تکثیر برای ژن‌های هدف با دستگاه ترموسایکلر (ABI، آمریکا) شامل یک چرخه واسرشت اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و به دنبال آن 30 چرخه شامل واسرشتگی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد، اتصال در دمای 52/8 درجه سانتی‌گراد (جهت *بیفیدوباکتریوم*) و دمای 62 درجه سانتی‌گراد (جهت *لاکتوباسیلوس*)، گسترش در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 45 ثانیه برای هر مرحله و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی در دمای 72 درجه

تعیین هویت فنوتیپی جنس *لاکتوباسیلوس* از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشاتی مانند کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، تولید اندول، حرکت و تخمیر قندها استفاده شد (16). در نهایت برای تعیین هویت مولکولی از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که در ادامه توضیح داده می‌شود.

جهت جداسازی و شمارش جنس *بیفیدوباکتریوم*، رقت‌های سریال هر نمونه بر روی محیط RCA تلقیح شده و ب‌صورت خطی کشت داده شد. سپس پلیت‌ها درون جاربی‌هوازی و با استفاده از گاز پک بی‌هوازی (Merck، آلمان) بمدت 72-48 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های رشد کرده به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت تعیین هویت فنوتیپی جنس *بیفیدوباکتریوم* از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشات کاتالاز، تولید اندول و دیسک‌های تشخیصی کاناماسین، ونکوماسین و کولیستین استفاده شد (17). سپس برای تعیین هویت مولکولی از PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده شد که در ادامه توضیح داده می‌شود. جهت جداسازی و شمارش باکتری‌های روده‌ای، رقت‌های سریال نمونه‌ها بر روی محیط MacConkey agar (Merck، آلمان) تلقیح شده و به مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌های صورتی به روش ذکر شده شمارش شدند. جهت تعیین هویت ایزوله‌های مشکوک به *اشریشیا کلی* از رنگ‌آمیزی گرم و آزمایشات بیوشیمیایی مانند کاتالاز و محیط کشت‌های TSI (Triple Sugar Iron)، SIM (Sulfide Indol Motility) (برای بررسی حرکت، تولید اندول و تولید SH₂)، (Methyl Red-Voges Proskauer)، (MR-VP)، اوره آگار و سیمون سیترات استفاده شد (Conda، کانادا) (18). جهت جداسازی و شمارش جنس *انتروکوکوس*، رقت‌های سریال نمونه‌ها بر روی محیط BEA (Bile-Esculin Agar) (Quelab، انگلستان) تلقیح و به صورت خطی کشت داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 35 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند،

ایران) بررسی شد. در صورت منفی شدن نتایج، آزمایشات تکثیری حداقل سه بار تکرار شد. برای تایید قطعات تکثیر شده از نظر وجود ژنهای مورد نظر، از ژنهای تکثیر یافته نمونه‌هایی جهت تعیین توالی (پیشگام، ایران) ارسال شد. نتایج تعیین توالی در NCBI مورد بررسی و BLAST قرار گرفت (تصاویر شماره 1 و 2).

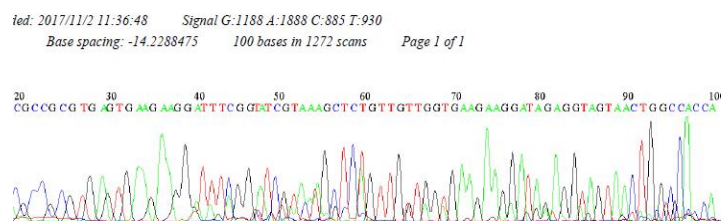
ساتی گراد به مدت 5 دقیقه بود. برای هر مرحله و در نهایت یک چرخه قابل ذکر است در تمامی موارد برای کنترل منفی از آب مقطر استریل دو بار تقطیر به جای ژنوم استفاده شد. وجود ژنهای مورد بررسی با استفاده از آگارز ژل الکتروفورز (ژل آگارز 1/5 درصد) و در کنار 50 bp DNA ladder مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس نتایج با استفاده از دستگاه ژل داکيومنتیشن (ATP)،



Bifidobacterium longum DNA, complete genome, strain: 105-A
Sequence ID: AP014658.1 Length: 2290145 Number of Matches: 4

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
377 bits(204)	6e-101	209/211(99%)	2/211(0%)	Plus/Minus
Query 9	ATTCGCGGCGCCGGGTACGGCCGGGCTTGAAGTGCGGTGGGGAGACTGGAAATCCCGGTGT	68		
Sbjct 1987030	ATTC-GC-GCCGGGTACGGCCGGGCTTGAAGTGCGGTGGGGAGACTGGAAATCCCGGTGT	1986973		
Query 69	AACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACCACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCG	128		
Sbjct 1986972	AACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACCACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCCG	1986913		
Query 129	TTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	188		
Sbjct 1986912	TTACTGACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCC	1986853		
Query 189	ACGCCGTAACGGTGGATGCTGGATGTGGGG	219		
Sbjct 1986852	ACGCCGTAACGGTGGATGCTGGATGTGGGG	1986822		

تصویر شماره 1: تایید جنس بیفیدوباکتریوم به روش تعیین توالی



Uncultured Lactobacillus sp. clone BV_LV_OTU6489 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Sequence ID: JQ962826.2 Length: 328 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
161 bits(87)	2e-36	92/94(98%)	1/94(1%)	Plus/Plus
Query 4	CAAGTCTGATGGAGC-ACGCCGCGTGAGTGAAGGATTTCCGATTCGTAAGCTCTGT	62		
Sbjct 172	CAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAGTTTCCGATTCGTAAGCTCTGT	231		
Query 63	TGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACCTGCC	96		
Sbjct 232	TGTTGGTGAAGAAGGATAGAGGTAGTAACCTGCC	265		

تصویر شماره 2: تایید جنس لاکتوباسیلوس به روش تعیین توالی

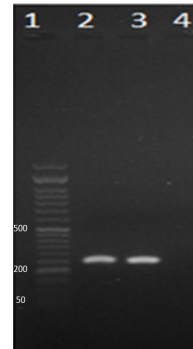
باکتری های مورد مطالعه در نمونه های مختلف ژژنوم، ایلئوم، دئودنوم و مدفوع ارتباط معناداری وجود نداشت ($P>0/05$)، به جز تعداد کل باکتری های بی هوازی در نمونه مدفوع روز 90 که ارتباط معنادار بین گروه تراریخته و دو گروه دیگر شامل گروه کنترل و گروه تغذیه شده با برنج غیر تراریخته دیده شد ($P=0/027$)، بدین صورت که در گروه تغذیه شده با برنج تراریخته در تعداد باکتری های بی هوازی کاهش دیده شده است. از سوی دیگر تعداد لاکتوباسیلوس ژژنوم در گروه تغذیه شده با برنج تراریخته نسبت به گروه کنترل و غیر تراریخته کاهش نشان داد. هم چنین بین جیره های متفاوت غذایی و در نمونه های مختلف ژژنوم، ایلئوم، دئودنوم و مدفوع برای اتروکوکوس تفاوت معنی داری دیده نشد. نتایج همه گروه ها در جدول شماره 1 نشان داده شده است.

جدول شماره 1: تعیین و مقایسه تعداد کل باکتری های هوازی و بی هوازی، بیفیدوباکتریوم، اتروکوکوس، لاکتوباسیلوس و اشریشیاکلی در نمونه های ایلئوم، دئودنوم، ژژنوم و مدفوع روزهای 60 و 90 در رت های تغذیه شده با برنج تراریخته (A) و غیر تراریخته (B) و غذای معمول رت (C)

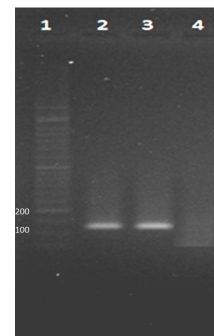
cfu/ml (Colony forming unit/millilitre)	میانگین تعداد کفیه ها			گروه غذای	باکتری	
	ژژنوم	ایلئوم	دئودنوم			
1250	906	1156	1488	13/38	A	کل باکتری های هوازی
1250	1275	1369	95	11	B	
1250	1569	1225	1312	13/12	C	
1	0/141	0/798	0/288	0/750		p value
725	1131	1462	1062	14/12	A	کل باکتری های بی هوازی
1650	1644	981	17	11/31	B	
1375	975	1306	988	12/06	C	
*0/027	0/138	0/376	0/054	0/710		p value
1062	1038	1356	1450	15/25	A	بیفیدوباکتریوم
1425	1281	1094	1150	10/94	B	
1262	1431	13	1150	11/31	C	
0/558	0/373	0/590	0/124	0/206		p value
1312	1038	1325	1162	14/56	A	اتروکوکوس
1362	1394	1206	1212	925	B	
1075	1319	1219	1375	13/69	C	
0/585	0/567	0/09	0/790	0/179		p value
11/19	85	1281	1325	18/44	A	لاکتوباسیلوس
12/19	1650	1188	1081	8/38	B	
14/12	1250	1281	1394	10/69	C	
0/664	0/076	0/943	0/471	0/05*		p value
1088	1250	1306	1325	13/62	A	اشریشیاکلی
1588	1294	1075	1388	12/44	B	
1075	1206	1369	1038	11/44	C	
0/222	0/970	0/634	0/565	0/821		p value

*: اختلاف معنی داری براساس آزمون Kruskal-Wallis بین سه گروه تغذیه با سطح معنی داری 0/05

نتایج حاصل از PCR و تعیین توالی حاکی از تایید جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم بوده است. نتایج بررسی محصول تکثیر ژن های 16S rRNA بیفیدوباکتریوم (224 bp) و لاکتوباسیل (126 bp) در تصاویر شماره 3 و 4 نشان داده شده است.



تصویر شماره 1: بررسی محصول ژن شناسایی کننده بیفیدوباکتریوم (224bp) ستون 1: 50 bp DNA Ladder، ستون 2 و 3: نمونه تکثیر یافته، ستون 4: کنترل منفی



تصویر شماره 2: بررسی محصول ژن شناسایی کننده لاکتوباسیلوس (126bp) ستون 1: 50 bp DNA Ladder، ستون 2 و 3: نمونه تکثیر یافته، ستون 4: کنترل منفی

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 16 (version 16, SPSS Inc., Chicago, IL) و آزمون آماری کروسکال والیس بررسی گردید.

یافته ها

در این مطالعه بین مصرف جیره های متفاوت غذایی (در سه گروه تراریخته، غیر تراریخته و کنترل) و فراوانی

بحث

رشد جمعیت جهانی و تقاضای رو به افزایش کشت محصولات زراعی از جمله برنج، محققین را بر این داشته تا محصولی فراوان در مقیاسی کوچک تر تولید نمایند. برنج تراریخته Bt این نیاز را فراهم ساخته تا با افزایش کمیت محصول، نیاز جوامع برطرف گردد و از سوی دیگر با آفاتی که سبب کاهش نتیجه و محصول می‌گردند مبارزه شود. از این رو مطالعات حیوانی فراوانی برای دستیابی به این هدف صورت گرفته است. گرچه مطالعات در دسترس، کم تر به تاثیر برنج تراریخته بر سلامت دستگاه گوارش پرداخته‌اند.

ارزیابی ایمنی برنج تراریخته بیان‌کننده CryIAb در زمینه‌های مختلف از جمله مشخص نمودن ترکیبات برنج، بررسی آلرژنیسته، آنالیزهای بیوشیمیایی و هماتولوژی و آنالیز ادرار در رت‌های تغذیه شده با آن، طی تحقیقات مختلفی صورت گرفته است و عوارض نامطلوبی در پی مصرف این نوع برنج مشاهده نشده است (24-22)، ولی با توجه به بحث‌های متفاوت پیرامون ایمنی محصولات تراریخته، مطالعه حاضر به بررسی تاثیر برنج تراریخته ایرانی با نام طارم مولایی بر سلامت دستگاه گوارش رت پرداخته است.

یکی از نگرانی‌های موجود در زمینه ایمنی برنج تراریخته، تاثیر این نوع از غذاها بر فلور میکروبی روده و انتقال آن به مصرف‌کننده می‌باشد (25) و آنچه که مشخص است، فلور میکروبی روده نقش عمده ای در سلامت میزبان بازی می‌کند (26). از جمله ارتباطی که بین میزان pH و محتوی باکتری در قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش وجود دارد، می‌توان به مصرف کربوهیدرات‌ها توسط باکتری‌های بی‌هوازی که منجر به تولید استات، پروپیونات، بوتیرات و دی‌اکسید کربن می‌شود اشاره کرد که این ترکیبات pH را تحت تاثیر قرار می‌دهند و در یک رابطه دو طرفه این تغییر pH سبب تغییر در ترکیب باکتری‌های گوارشی می‌شود (12). در این مطالعه مداخله‌ای - تجربی به بررسی اثر برنج تراریخته طارم

مولایی بر فلور میکروبی روده رت پرداخته شده است. مطالعات مشابه در زمینه مصرف محصولات تراریخته از قبیل ذرت، سویا و همچنین برنج‌های تراریخته دیگر وجود دارد و این در حالی است که مطالعه حاضر برای نخستین بار صورت گرفته است (27،28).

در مطالعات پیشین مواجه 6 هفته‌ای حیوان با غذای تراریخته را به‌عنوان کوتاه‌ترین زمان ممکن برای تغییرات فلور میکروبی روده مطرح کرده‌اند و این زمان به‌عنوان حداقل زمانی است که فلور میکروبی روده در اثر مصرف غذا می‌تواند تغییر یابد و تعدادی از بررسی‌ها این زمان را جهت مصرف غذای تراریخته ایمن دانسته‌اند (29). بیش‌ترین نگرانی که در بین افراد جامعه وجود دارد مربوط به تاثیرات بلند مدت غذای تراریخته بر سلامت است. از این رو مشابه مطالعات صورت گرفته، دوره 90 روزه جهت بررسی تاثیرات برنج تراریخته انتخاب گردید.

نتایج نشان داد که بین مصرف برنج تراریخته و تعداد باکتری‌های *اشریشیاکلی*، *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم*، *اِتروکوکوس* و تعداد کل باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی ارتباط معناداری وجود ندارد و تفاوتی بین ترکیب باکتری‌ها در قسمت‌های مختلف روده و هم‌چنین نمونه مدفوع گرفته شده در زمان‌های مختلف در سه گروه غذایی انتخاب شده، وجود ندارد به جز تغییرات معنی‌دار ($P < 0/05$) که در تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی نمونه مدفوع روز 90 گروه تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با دو گروه دیگر مشاهده شد و کاهش قابل توجهی در این گروه قابل مشاهده بود و همچنین افزایش در تعداد *لاکتوباسیلوس ژژنوم* گروه تراریخته در مقایسه با گروه کنترل و گروه تغذیه شده با برنج غیر تراریخته مشاهده شد.

مکانیسمی که در پس این تغییرات وجود دارد ناشناخته بوده و از این رو مطالعات گسترده‌تری نیاز است تا مشخص گردد آیا این تغییرات از لحاظ بیولوژیک معنادار هستند یا خیر. از آن‌جاکه فلور میکروبی روده در توسعه عملکردهای متابولیک و ایمنولوژیک نقش

کشت دثودنوم 13 درصد کاهش در جمعیت بیفیدوباکتریوم در رت‌های تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با کنترل مشاهده شد و همچنین افزایش 23 درصد در جمعیت کولی فرم‌ها در نمونه ایلنوم دیده شده است (22). با توجه به مطالعه Liu که به بررسی اثر برنج تراریخته Bt بیان‌کننده پروتئین CryIAb بر روده خوک‌ها طی دو نسل پرداخته است، در انتهای مطالعه در روزهای 360 و 420 تغییرات پاتولوژیکی و میکروبیولوژی مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج حاکی از عدم وجود اثرات نامطلوب برنج تراریخته Bt بر روده خوک‌ها بوده است (32). در مجموع می‌توان این مسئله را بیان داشت که سلامت گوارش انسان‌ها دارای طبیعت پیچیده‌ای است که متاثر از فاکتورهای متفاوتی از قبیل پارامترهای بیوشیمیایی و هماتولوژی، تغییرات هیستوپاتولوژی و تغییرات پروفایل میکروبی و ... می‌باشد و تمام این فاکتورها در ارتباط با یکدیگر سلامت گوارش و به طبع سلامت میزبان را به همراه داشته و مطالعه تغییرات نامطلوب در هر قسمت می‌تواند راهگشای تصمیم‌گیری در زمینه مصرف محصولات تراریخته گردد.

در نهایت، در مطالعه حاضر مشاهده شد که استفاده از برنج تراریخته طارم مولایی ایرانی بیان‌کننده پروتئین CryIAb تاثیری مشهود بر تعداد باکتری‌های فلور میکروبی روده رت ندارد. البته با توجه به تغییرات دو گروه (باکتری‌های بی‌هوازی مدفوع در روز 90 و تعداد لاکتوباسیلوس‌های ژزنوم) نیاز به انجام مطالعات گسترده‌تر می‌باشد. همچنین باید توجه شود که نتایج مطالعه حاضر هیچگاه برای قضاوت در مورد ایمنی برنج تراریخته کافی نیست. بلکه برای دستیابی به یک نتیجه‌گیری جامع در مورد سلامت برنج تراریخته نیاز به انجام مطالعات در سایر حیوانات آزمایشگاهی نظیر موش، میمون، طپور و ... می‌باشد. حتی لازم است در مطالعات آینده به‌طور بلندمدت در بازه‌های زمانی بیش‌تر از 90 روز تاثیر مصرف برنج تراریخته مورد آزمایش قرار گیرد تا اثر تغذیه بلندمدت با برنج تراریخته بر فلور

داشته و عدم تعادل در ترکیب فلور میکروبی سبب بیماری‌هایی از قبیل IBD (Inflammatory Bowel Disease) می‌شود، در نتیجه تعادل در ترکیب فلور میکروبی روده سلامت میزبان را به همراه خواهد داشت و این در حالی است که برهم خوردن این تعادل منجر به بیماری‌های متابولیک می‌گردد. تعدادی از مطالعات موجود، تغییر در تعداد باکتری‌های مدفوع در نتیجه مصرف برنج تراریخته را نشان داده‌اند، ولی تغییرات هیستوپاتولوژیک نامطلوبی مشاهده نشده است و نیز تعدادی از مطالعات انجام شده همگام با مطالعه حاضر عدم تاثیر غذای تراریخته حامل Bt بر فلور میکروبی روده را به اثبات رسانده‌اند. چنانچه Buzoianu و همکاران در سال 2012 با بررسی اثر ذرت تراریخته Bt بر خوکچه از نظر تعداد باکتری‌های ایتروکوکوس، لاکتوباسیلوس و کل باکتری‌های بی‌هوازی در روزهای 0 تا 100 در نمونه مدفوع، ایلنوم و سکوم نشان دادند که ارتباط معنی‌داری بین تعداد باکتری‌های مورد مطالعه و نوع رژیم غذایی وجود ندارد و رژیم غذایی حاوی ذرت Bt بر تعداد باکتری‌های روده تاثیرگذار نمی‌باشد (30). همچنین همسو با این نتایج ذکر شده، Buzoianu و همکاران در سال 2013 با بررسی اثر ذرت تراریخته بیان‌کننده CryIb بر فلور میکروبی روده خوک و فرزندان متولد شده از آن‌ها، عدم تاثیر رژیم غذایی حاوی ذرت تراریخته بر فلور میکروبی روده که شامل باکتری‌های ایتروباکتر، لاکتوباسیلوس و تعداد کل باکتری‌های بی‌هوازی در نمونه‌های مدفوع، ایلنوم و سکوم بوده است، را نشان دادند (31). مطابق با نتایج مطالعه حاضر، مطالعه‌ای توسط Schroder و همکاران در سال 2007 صورت گرفته است که در آن تاثیرات برنج تراریخته بیان‌کننده CryIAb بر فاکتورهای هماتولوژی، بیوشیمیایی و میکروبیولوژی رت مورد مطالعه قرار گرفته است. در این مطالعه 90 روزه، نتایج بیانگر عدم وجود تفاوت معنادار در تعداد باکتری‌های مدفوع رت‌های تغذیه شده با برنج تراریخته در مقایسه با گروه کنترل بود. البته در راستای این مطالعه، در نمونه

میکروبی حیوانات نیز مورد ارزیابی واقع شود.

ریاست جمهوری با کد گرنت 95/10710 و در آزمایشگاه مرکز تحقیقات سلامت و ایمنی غذا- دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد انجام گرفته است. بدین وسیله از حمایت‌های این مرکز سپاس و قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

این طرح با حمایت مالی معاونت علمی و فناوری

References

- Turnbull C, Lillemo M, Hvoslef-Eide AKT. Global Regulation of Genetically Modified Crops Amid the Gene Edited Crop Boom – A Review. *Front Plant Sci* 2021; 12: 630396.
- Nicolia A, Manzo A, Veronesi F, Rosellini D. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research. *Crit Rev Biotechnol* 2014; 34(1): 77-88.
- Jeon DW, Park JR, Jang YH, Kim EG, Ryu T, Kim KM. Safety verification of genetically modified rice morphology, hereditary nature, and quality. *Environ Sci Eur* 2021; 33: 37.
- Choi H, Moon JK, Park BS, Park HW, Park SY, Kim TS, et al. Comparative nutritional analysis for genetically modified rice, Iksan483 and Milyang 204, and nontransgenic counterparts. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2012; 55(1): 19-26.
- Bhullar NK, Gruissem W. Nutritional enhancement of rice for human health: the contribution of biotechnology. *Biotechnol Adv* 2013; 31(1): 50-57.
- Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, de Palma JM, Liwanag EA, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA (b) gene. *Mol Breed* 1997; 3(5): 401-414.
- Hajimohammadi B, Eslami G, Loni E, Ehrampoush MH, Moshtaghioun SM, Fallahzadeh, et al. Relationship between Serum Tumor-Related Markers and Genetically Modified Rice Expressing Cry1Ab Protein in Sprague-Dawley Rats. *Nutr Cancer* 2022; 74(7): 2581-2590.
- Hajimohammadi B, Eslami G, Zandi H, Ehrampoush MH, Naimi A, Derakhshan M, et al. Safety assessment of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein in Sprague-Dawley rats. *Sci Rep* 2021; 11(1): 1126.
- Cao S, He X, Xu W, Ran W, Liang L, Luo Y, et al. Safety assessment of Cry1C protein from genetically modified rice according to the national standards of PR China for a new food resource. *Regul Toxicol Pharmacol* 2010; 58(3): 474-481.
- Vázquez-Padrón RI, González-Cabrera J, García-Tovar C, Neri-Bazan L, López-Revilla R, Hernández M, et al. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 27(1): 54-58.
- Einspanier R, Lutz B, Rief S, Berezina O, Zverlov V, Schwarz W, et al. Tracing residual recombinant feed molecules during digestion and rumen bacterial diversity in cattle fed transgene maize. *Eur Food Res Technol* 2004; 218: 268-273.
- Laparra JM, Snaz Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceutical. *Pharmacol Res* 2010; 61(3): 219-225.
- Underwood W, Anthony R, Cartner S, Corey D, Grandin T, Greenacre C, et al. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals.

- Schaumburg, IL: American Veterinary Medical Association; 2013.
14. Procop GW. The anaerobic bacteria. In: Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL, editors. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. p. 1041-1042.
 15. Poulsen M, Kroghsbo S, Schrøder M, Wilcks A, Jacobsen H, Miller A, et al. A 90-day safety study in Wistar rats fed genetically modified rice expressing snowdrop lectin *Galanthus nivalis* (GNA). *Food Chem Toxicol* 2007; 45(3): 350-363.
 16. Wang J, Chen X, Liu W, Yang M, Zhang H. Identification of *Lactobacillus* from koumiss by conventional and molecular methods. *Eur Food Res Technol* 2008; 227(5): 1555-1561.
 17. Khomeiri M, Mortazavi SA, Ghoddusi HB, Khamessan A, Ahmad D, Shahidi F. Identification of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Fecal Samples of Some Iranian Subjects Using 16SrRNA Gene Sequence Analysis and PCR-based Gene Specific Primers. *JKMU* 2005; 12(1): 21-31.
 18. Rahman M, Husna A, Elshabrawy HA, Alam J, Runa NY, Badruzzaman AT, et al. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* from chicken meat. *Sci Rep* 2020; 10(1): 21999.
 19. Eslami H, Shariatifar A, Rafiee E, Shiranian M, Salehi F, Hosseini SS, et al. Decolorization and biodegradation of reactive Red 198 Azo dye by a new *Enterococcus faecalis*-*Klebsiella variicola* bacterial consortium isolated from textile wastewater sludge. *World J Microbiol Biotechnol* 2019; 35(3): 38.
 20. Dashti AA, Jadaon MM, Abdulsamad AM, Dashti HM. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Med J* 2009; 41(2): 117-122.
 21. Delroissea JM, Boulvina AL, Parmentierb I, Dauphinc R, Vandebola M, Portetelle D. Quantification of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in rat fecal samples by real-time PCR. *Microbiol Res* 2008; 163(6): 663-670.
 22. Schroder M, Poulsen M, Wilcks A, Kroghsbo S, Miller A, Frenzel T, et al. A 90-day safety study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein (*Bacillus thuringiensis* toxin) in Wistar rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 45(3): 339-349.
 23. Shirdeli M, Orlov YL, Eslami G, Hajimohammadi B, Tabikhanova LE, Ehrampoush MH, et al. Testing safety of genetically modified products of rice: case study on sprague dawley rats. *Russ J Genet Appl Res* 2019; 55(8): 962-968.
 24. Song H, He X, Zou S, Zhang T, Luo Y, Huang K, et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified rice expressing Cry1Ab protein in Sprague-Dawley rats. *Transgenic Res* 2015; 24: 295-308.
 25. European food safety authority (EFSA). Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: The role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol* 2008; 46(Suppl1): S2-S70.
 26. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90(3): 859-904.
 27. Tan J, Sun Z, Zhang H, Wang Y, Liu D. Comparison of broiler performance, carcass yields and intestinal microflora when fed diets containing transgenic (Mon-40-3-2) and conventional soybean meal. *Afr J Biotechnol* 2012; 11(59): 12371-12378.

28. Yuan Y, Xu W, He X, Liu H, Cao S, Qi X, et al. Effects of genetically modified T2A-1 rice on the GI health of rats after 90-day supplement. *Sci Rep* 2013; 3: 1962
29. Castillo M, Martí'n-Oru'e SM, Anguita M, Pe'rez JF, Gasa J. Adaptation of gut microbiota to corn physical structure and different types of dietary fibre. *Livest Sci* 2007; 109(1-3): 149-152.
30. Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, O'Sullivan O, Crispie F, Cotter PD, et al. The effect of feeding Bt MON810 maize to pigs for 110 days on intestinal microbiota. *PloS One* 2012; 7(5): e33668.
31. Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC, Quigley L, O'Sullivan O, Cotter PD, et al. Sequence-based analysis of the intestinal Microbiota of sows and their offspring fed genetically modified maize expressing a truncated form of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein (Bt Maize). *Appl Environ Microbiol* 2013; 79(24): 7735-7744.
32. Liu Q1, Yang W1, Li M1, Wang Y1, Zhang H, Wu Y, et al. Effects of Transgenic Bt Rice Containing the Cry1Ab Protein on the Gastrointestinal Health of Highly Inbred Wuzhishan Pigs after Two Generations of Feeding. *J Agric Food Chem* 2018; 66(40): 10575-10587.