

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

Elham Mousavi¹,
Farhad Nazarian-Firouzabadi²,
Ahmad Ismaili³

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)

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 *efaA* (endocarditis antigen), *as*, *ace*, *esp* and *gelE* 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 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 CO₂ from glucose (KX185054) and one with no CO₂ 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 *efaA* (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).

بررسی طیف آنتی‌بیوگرام و ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی دو سویه انتروکوکوس فاسیوم جداسازی شده از شیرهای 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 شیرهای درخت بلوط (*Quercus brantii* var. *persica*) به منظور معرفی باکتری‌های مفید جهت کاربرد در مابزره بیولوژیک و به عنوان باکتری‌های صنعتی بود.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های اسیدلاکتیک موجود در شیرهای گیاه با روش‌های متداول کشت، خواص بیوشیمیایی و توالی‌یابی ۱۶S rRNA 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 ونکوماسین، آمپی‌سیلین، سیپروفلوکساسین و نیتروفورانتوئین حساس بودند. دو سویه باکتری انتروکوکوس فاسیوم یکی با توانایی تولید گاز CO₂ از گلوکز (KX185054) و دیگری ناتوان در تولید گاز CO₂ (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 بیولوژیک باشند.

واژه‌های کلیدی: اسیدلاکتیک، بلوط، آنتی‌بیوتیک، ژن بیماری‌زایی، انتروکوکوس فاسیوم

مقدمه

پروبیوتیک‌ها متعلق به گروه بزرگی از باکتری‌های اصلی فلور میکروبی دستگاه گوارش موجودات زنده از جمله انسان هستند که در آن‌جا زندگی همسفرگی

پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده و مفیدی هستند که در انسان یا حیوان، با اثر بر روی فلور میکروبی بدن، اثرات مفیدی بر سلامت میزبان دارند. اکثر

Email: nazarian.f@lu.ac.ir

مؤلف مسئول: فرهاد نظریان فیروزآبادی - خرم آباد: دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی

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

بی‌ضرری دارند (۲۱). 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 بر روی 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). اخیراً 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 بیماری‌زا 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 مخصوصاً 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 انتروکوک‌کی 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 باکتری‌ها، دو گونه انتروکوکوس فکالیس و انتروکوکوس فاسیوم می‌باشند (۱۰). گونه‌های انتروکوکوس فکالیس حدود ۸۰ تا ۹۰ درصد و انتروکوکوس فاسیوم حدود ۱۰ درصد از کل عفونت‌های انسانی ناشی از این جنس را به خود اختصاص می‌دهند (۱۱). بیماری‌زایی انتروکوک‌ها توسط ژن‌های کدکنده‌ی 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^۱ 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 پاراکازنی^۲ زیرگونه پاراکازنی، انتروکوکوس فکالیس^۳، انتروکوکوس فاسیوم^۴، لاکتوباسیلوس کورواتوس^۵، لاکتوکوکوس لاکتیس^۵ زیرگونه لاکتیس قادرند باکتریوسین تولید کنند (۱۳). امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی

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

در شیرهای این گیاه زندگی می‌کنند (۲۱، ۲۴). این مطالعه به منظور شناسایی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیرهای 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 روش‌ها

نمونه‌برداری

از تعداد ۶ نمونه شاخه‌های جوان درخت بلوط مربوط به ۶ درخت مختلف به صورت 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 هوازای 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

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 کننده‌ی سایر باکتری‌های بیمارزا از منابع مختلف، مثل گیاهان دارویی حائز اهمیت است (۱۵). بلوط ایرانی^۱ متعلق به خانواده‌ی راش یا بلوط^۲ 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 (۱۷، ۱۸). در یکی از مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، سه جدایه از باکتری‌های اسیدلاکتیک میله‌ای شکل و متحرک از شیرهای 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 شیرهای درخت بلوط را گزارش کردند (۲۰). مطالعات نشان داده است که برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک نظیر لاکتوباسیلوس‌ها، انتروکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس

1. *Quercus Persica*
2. *Fagaceae*

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

غربال اولیه باکتریایی توسط آزمون های بیوشیمیایی

شناسایی مورفولوژیکی ایزوله ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم براساس روش کریستیان گرم (۲۵) و تست کاتالاز بر اساس روش کلارک و کوان (۲۶)، آزمون تخمیر قند گلوکز و تولید گاز دی اکسید کربن حاصل از تخمیر قند گلوکز، رشد در غلظت ۶/۵ درصد کلرید سدیم، رشد در دماهای ۱۵، ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی گراد، رشد در pH=۴/۴ و pH=۹/۶ در محیط MRS مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی، جهت انجام آزمون گرم، یک قطره از سوسپانسیون باکتری روی یک لام تمیز قرار داده شد و پس از تثبیت سلول های باکتری، رنگ آمیزی با کیت رنگ آمیزی گرم انجام شد پس از شستشو و خشک نمودن اسلاید، اسلایدها زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. در این آزمون باکتری های گرم مثبت به رنگ ارغوانی مایل به آبی تیره دیده شدند. به منظور تعیین وجود یا عدم وجود آنزیم کاتالاز در باکتری ها، از آب اکسیژنه (H_2O_2) و بر اساس روش آکابندا استفاده شد (۲۷). برای انجام آزمون تخمیر قند گلوکز، به هریک از لوله های آزمایش، قند گلوکز استریل ۲ درصد و معرف فنل رد به میزان ۰/۵ گرم بر لیتر افزوده شد. پس از تلقیح، باکتری ها 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 دی اکسید کربن حاصل از تخمیر قند گلوکز از لوله های درهمام استفاده شد که تجمع گاز در لوله های درهمام و شناور شدن آن ها نشانه ای مثبت بودن آزمون بود.

آزمون های مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش داس و داش صورت گرفت (۲۸). برای بررسی کمیت و کیفیت

DNA استخراج شده از میزان جذب OD_{260}/OD_{280} توسط اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد.

تکثیر ناحیه ی *16S rRNA*

واکنش PCR با آغاز گرهای اختصاصی (fd1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ; rP2: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3') انجام شد (۲۹). واکنش زنجیره ای پلی مرز با یک چرخه ی واسرشت سازی اولیه ($94^{\circ}C$) به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه ی واسرشت سازی ($94^{\circ}C$) به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغاز گر ها به DNA الگو ($56^{\circ}C$) به مدت ۱ دقیقه و تکثیر DNA الگو ($72^{\circ}C$) به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه تکثیر نهایی در ($72^{\circ}C$) به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. واکنش PCR با بافر کامل ($10\times$) به مقدار ۲/۵ μl ، dNTP ($100mM$) به مقدار ۰/۵ μl ، آغاز گرهای رفت و برگشت (fd1 و rP2) هر کدام به غلظت ۱۰ pm به مقدار ۱ μl ، آنزیم Taq ($5u/\mu l$) به مقدار ۰/۳ μl و DNA ($50ng/\mu l$) و با آب مقطر استریل تا رساندن به حجم نهایی (۲۵ μl) انجام شد. برای تفکیک قطعات تکثیر یافته از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد.

خالص سازی ناحیه ی *16S rRNA* و توالی یابی

خالص سازی DNA بر اساس دستورالعمل کیت از ژل (شرکت فرمنتاز) صورت گرفت. محصول PCR خالص سازی شده، توسط روش توالی یابی ختم زنجیره ی سانجر و با استفاده از آغاز گرهای اختصاصی مربوط (fd1 و rP2) صورت گرفت. نتایج حاصل از توالی یابی دوطرفه از دو طرف با استفاده از نرم افزار Vector.NTI.v10.3 و براساس نقاط همپوشان بین توالی ها به صورت کانتیگ درآمد. توالی حاصل از کانتیگ ها به کمک ویرایش دستی در نرم افزار BioEdit اصلاح شدند و نوکلئوتیدهای نامربوط و مبهم به کمک

پیک‌های مربوطه جایگزین شدند. توالی تعداد ۳۱ گونه از انتروکوکوس‌ها و تعداد ۲۴ گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیک از پایگاه داده NCBI اخذ شد. هم‌ردیفی مربوط به توالی ژن rRNA ۱۶S 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 به وسیله نرم‌افزار MEGA6 ترسیم شد (۳۰). از باکتری *Bacillus subtilis* به عنوان برون گروه در ترسیم درخت فیلوژنی کل باکتری‌های LAB و از باکتری *Tetragenococcus solitarius* به عنوان برون گروه در ترسیم درخت فیلوژنی باکتری‌های جنس انتروکوکوس استفاده شد. ارزش اعتماد شاخه‌های درخت فیلوژنی توسط تجزیه و تحلیل بوت‌استرپ^۱ بر اساس تعداد ۱۰۰۰ نمونه‌گیری فلنشتین^۲ 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 برات (۵/۵ مک فارلند)، به کمک یک سواب استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. ابتدا تمام سطح پتری به وسیله سوسپانسیون باکتری آغشته شد تا یک کشت متراکم و یک دست تولید شود. سپس از قرص‌های آنتی‌بیوتیک: سیروفلوکساسین، 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 فاصله مناسب از هم درون پتری‌ها قرار داده شد. بعد از خشک شدن

محیط، پلیت‌ها در انکوباتور 37°C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از رشد باکتری، نتایج آزمون مورد بررسی قرار گرفت. عدم رشد باکتری در اطراف هر کدام از آنتی‌بیوتیک‌ها به منزله حساسیت باکتری به آن آنتی‌بیوتیک در نظر گرفته شد.

بررسی ژن‌های بیماری‌زایی

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 مدت زمان ۱ دقیقه بودند (۳۲). لازم به ذکر است که در آزمون تعیین حساسیت و شناسایی ژن‌های عامل بیماری‌زایی، از باکتری *E. faecalis* (ATCC 29212) به عنوان شاهد استفاده شد.

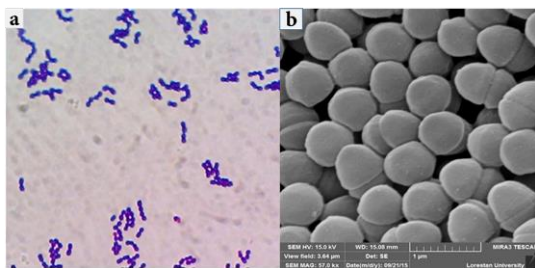
جدول شماره ۱: آغازگرهای PCR و شرایط واکنش

نام آغازگر	توالی آغازگر (5'→3')	طول توالی تکثیر شونده (bp)	دمای اتصال (C)
ACE1(F)	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	۳۲۰	۵۶
ACE2(R)	TCTATCACATTCGGTTGCG		
gelE1(F)	AGTTTCATGCTCTATTCTTCAC	۴۰۲	۵۶
gelE2(R)	CTTCATTATTACACGTTTG		
efaA1(F)	CGTGAGAAAGAAATGGAGGA	۴۹۹	۵۶
efaA2(R)	CTACTAACACGTCACGAATG		
AS1(F)	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	۴۰۶	۵۴
AS2(R)	TAGCTTTTTCATCTTGTTTGTT		
esp46(F)	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC	X repeats	۵۸
esp47(R)	CCAAGTATACCTAGCATCTTTTGG		

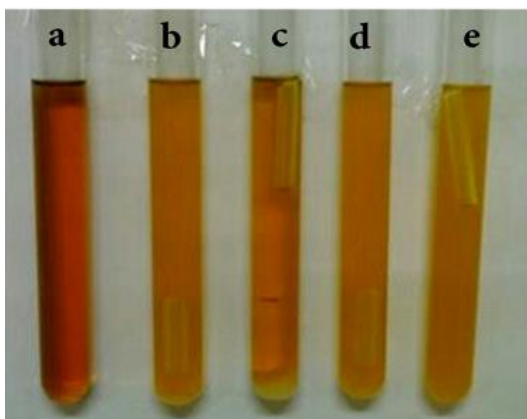
مشاهدات میکروسکوپ نوری و الکترونی

بررسی مورفولوژیک تک سلول باکتری با استفاده از میکروسکوپ نوری و 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 آن‌ها با استفاده از

1. Bootstrap
2. Felsenstein



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



تصویر شماره ۲: 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 (۶/۵ w/v) درصد و رشد در دمای ۱۰ و ۲۸ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد و رشد در pH=۹/۶ بودند، به عنوان آنتروکوکوس 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

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 گلو تار آلدئید^۱ استفاده شد (۳۳). پس از تثبیت باکتری‌ها، مراحل آماده‌سازی 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.

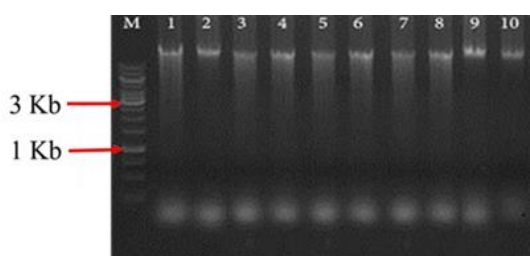
یافته‌ها

در این آزمایش از بین ۵۳۴ کلنی اولیه، تعداد ۲۸۵ کلنی (۵۳/۳۷ درصد) انتخاب شدند که از لحاظ ویژگی‌های ظاهری نماینده‌ی همه باکتری‌ها بودند. از تعداد کلنی برای آزمون‌های مورد نظر استفاده شد. تعداد ۱۶۰ کلنی (۵۶/۱ درصد) کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند. مشاهدات میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی 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 (۶/۵ w/v) درصد را داشتند.

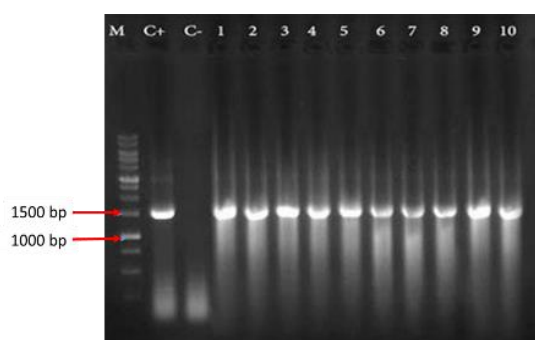
1. glutaraldehyde

TGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGT
TTAATTTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
TGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCC
CTTCGGGGGCAAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTC
GTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT
CAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAA
CCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG
GAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGC
TAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGC
TGCAACTCGCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCACGCCCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTT
GTAACACCCGAAGTCGGTGAGTAACCTTTTGAGC
CAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTGGGGTGAA
GTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCT
GGATCA

تصویر شماره ۳: توالی ناحیه rRNA ۱۶S در باکتری سویه
KX185054 به طول ۱۵۳۵ bp جداسازی شده از شیرهای بلوط.



تصویر شماره ۴: استخراج DNA ژنومی از باکتری‌های اتریکوکوس.
چاهک M: نشانگر ۱Kb، چاهک‌های ۱ تا ۱۰ مربوط به نمونه‌هایی
از DNA ژنومی (۱۰ μg/μl) تعداد ۱۰ کلنی از باکتری‌هاست.



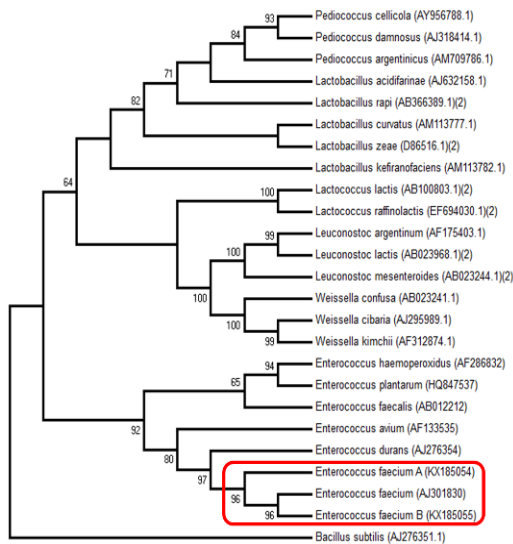
تصویر شماره ۵: تکثیر ناحیه rRNA ۱۶S با استفاده از آغاز گرهایی
عمومی. M: نشانگر ۱Kb، C-: کنترل منفی، C+: باکتری E. coli،
چاهک‌های ۱ تا ۱۰ محصول PCR مربوط به تعداد ۱۰ کلنی از
باکتری‌های اتریکوکوس فاسیوم. همان‌طور که مشاهده می‌شود،
باند مربوط به تکثیر ناحیه rRNA با اندازه مورد نظر (۱۵۰۰ bp) هم-
خوانی دارد.

گلوکز گاز تولید کند ولی قادر به رشد در pH=۴/۴ نبود
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 حرکت باکتری استفاده
شد که هر دو سویه واکنش‌های مشابهی را نشان دادند
جهت شناسایی دقیق‌تر سویه به روش‌های نوین مولکولی،
پس از استخراج DNA توالی ناحیه rRNA ۱۶S ای آن‌ها
تکثیر و به توالی‌یابی ارسال گردید (تصویر شماره ۳).
نتایج توالی‌یابی برای این سویه‌ها در بانک ژن نشان داد،
توالی ناحیه‌ی rRNA ۱۶S سویه‌ی A (KX185054) با
۹۹ درصد تشابه آن در طول ۱۵۳۵ نوکلئوتید به باکتری
Enterococcus faecium سویه‌های NR_114742.1،
AY172570.1 و KP326370.1 مشابهت داشت و
همچنین این ناحیه در باکتری سویه‌ی B (KX185055)
با ۹۹ درصد مشابهت در طول ۱۴۷۷ نوکلئوتید سویه‌های
LC035125.1، FJ378687.1 و KP326370.1 به باکتری
Enterococcus faecium نزدیک بود (تصاویر شماره ۴ و ۵).

A)

> Enterococcus faecium A (KX185054)
TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCATAATAC
ATGCAAGTCAAACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTG
CTCCACCGGAAAAAGAGGAGTGCGGAACGGGTGAG
TAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAAAAGGGGATA
ACACTTGGAACAGGTGCTAATACCGTATAACAATC
GAAACCGCATGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTCGG
GTGTCGCTGATGGATGGACCGCGGTGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGC
ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAAACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGC
AGTAGGGAATCTTCGGCAATGGCAAAAAGTCTGAC
CGAGCAACGCCGCGTGAGTGA AAAAGGTTTTCGGA
TCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGA
GAGTAACTGTTTATCCCTTGACGGTATCTAACCAGA
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGATTATTGGG
CGTAAAGCGAGCGCCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGAT
GTGAAACCCCCCGGCTCAACCCGGGGAGGGTCATT
GGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA
TGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGT
CTGTAAGTACGCTGAGGCTAGAAAAGCGTGGGGAG
CAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTA
AACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCT
TCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTG
GGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAAT

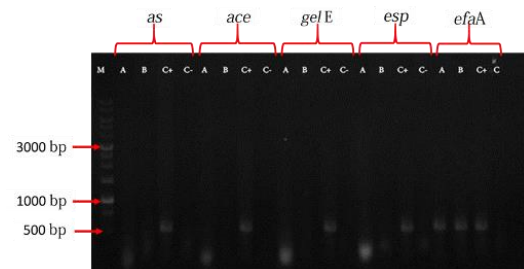
بلوط با نمونه‌های منتخب از جنس انتروکوکوس قرابت نزدیک‌تری را نشان می‌دهند.



تصویر شماره ۷: درخت فیلوژنی با روش حداکثر تطابق بر اساس توالی ناحیه rRNA ۱۶S از گونه‌های مختلف جنس‌های اسید لاکتیک. از باکتری *Bacillus subtilis* به‌عنوان برون‌گروه برای ریشه‌دار نمودن درخت استفاده شد. اعداد روی شاخه‌ها مقادیر بوت استرپ با تعداد تکرار ۱۰۰۰ را نشان می‌دهند. کد دسترسی سوه‌ها در داخل پرانتز نمایش داده شد.

در ادامه برای اطمینان بیش تر و تأیید تشخیص موقعیت فیلوژنتیک جدایه ها در سطح گونه، مراحل تعیین بهترین هم ردیفی، ترسیم درخت فیلوژنی برای جدایه های حاصل از شیرهی بلوط و گونه های جنس *Antrocochos* انجام گرفت. موقعیت فیلوژنتیکی ژن های rRNA 16S جدایه های حاصل از شیرهی بلوط نزدیکی تکاملی بسیار زیادی به گونه های *Antrocochos* فاسیوم را نشان دادند (تصویر شماره ۸). همان طور که ملاحظه می شود، دو سویه ی A و B این مطالعه در کلاد مربوط به باکتری *Antrocochos* قرار گرفته اند و اعتبار آماری این درخت در شاخه های مربوط به کلاد *Antrocochos* ها ۹۸ درصد می باشد.

نتایج حاصل از آزمون تعیین حساسیت سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جداسازی شده از شیرهای 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، سپروفلوکساسین 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 ۴: الکتروفورز محصول ژن‌های بیماری‌زایی در سویه‌های Enterococcus faecium B و Enterococcus faecium A (KX185054) (KX185055) جداسازی شده از شیرهای بلوط به کمک تکنیک PCR تخصصی. اندازه محصول PCR ژن efaA (۴۹۹bp) می‌باشد.

تصویر شماره ۷، درخت فیوزنی مربوط به باکتری اسیدلاکتیک به همراه دو سویه‌ی A و B این مطالعه را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود توالی تقریباً کامل ناحیه‌ی rRNA ۱۶S جدا به‌های حاصل از شیرهای

Phylogenetic tree showing the relationships between various *Enterococcus* species, with bootstrap values indicated at the nodes. The tree is rooted on the left and branches to the right. A red box highlights the clade containing *Enterococcus faecium* strains.

Species and Accession Numbers (from top to bottom):

- Enterococcus cacaec* (AY943820)
- Enterococcus silesiacus* (AM039966)
- Enterococcus ureilyticus* (AJ276352)
- Enterococcus haemophisporius* (AF266832)
- Enterococcus termitis* (AM039968)
- Enterococcus plantarum* (HQ847537)
- Enterococcus faecalis* (AB011212)
- Enterococcus rivorum* (F1882765)
- Enterococcus phenolicicola* (AY028437)
- Enterococcus canis* (X76177)
- Enterococcus durans* (AJ276354)
- Enterococcus hirae* (Y17302)
- Enterococcus faecium* (NR 114742.1)
- Enterococcus faecium* A (KX185054)
- Enterococcus faecium* B (KX185055)
- Enterococcus dispar* (AF061007)
- Enterococcus caninite* (AJ888906)
- Enterococcus asini* (Y11621)
- Enterococcus hermanningiensis* (AY396047)
- Enterococcus pallens* (DQ411812)
- Enterococcus pseudodavium* (AF061002)
- Enterococcus avium* (AF133535)
- Enterococcus gilvus* (DQ411810)
- Enterococcus casseliflavus* (AF039903)
- Enterococcus gallinarum* (AF039900)
- Enterococcus sulfureus* (AF061001)
- Enterococcus olivae* (JQ283454)
- Enterococcus saccharolyticus* (AF061004)
- Enterococcus lemniai* (AF445301)
- Enterococcus eurekaensis* (AF445305)
- Enterococcus cecorum* (AF061009)
- Enterococcus columbae* (AF061006)
- Tetrahymena solitaria* (AF101840)

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

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، ملی‌یوز 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 $pH=9/6$ 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 فکاليس* (نزدیک‌ترین گونه به *فاسیوم*) می‌شود، قندهایی چون سوربیتول، ملی‌یوز، 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 *rRNA 16S* استفاده می‌شود (۴۸). در این مطالعه پس از استخراج DNA ژنومی از باکتری‌ها، ناحیه‌ی *rRNA 16S* ی آن‌ها با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای عمومی تکثیر شد. پس از تعیین توالی ناحیه *rRNA 16S* باکتری‌ها، توالی‌یابی به صورت دوطرفه انجام شد، بدین صورت که از هر طرف محصول PCR تا حداکثر ۱ Kb توالی‌یابی شد. تعیین بهترین هم‌ردیفی بین توالی *rRNA 16S* و توالی‌های *rRNA 16S* 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 شیرهای بلوط این مطالعه با توالی ناحیه *rRNA 16S* 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 *rRNA 16S* باکتری‌های *انتروکوکوس* این مطالعه همراه با توالی‌های ژن *rRNA 16S* ی گونه‌های سایر جنس‌های اسیدلاکتیک با استفاده از نرم‌افزارهای Clustal W هم‌ردیف شدند.

همانطور که مشاهده می‌شود، توالی تقریباً کامل ناحیه‌ی rRNA ۱۶S جدایه‌های حاصل از شیرهای 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 کلاهای 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 $^{\circ}\text{C}$ ۴۵-۱۰، دامنه‌ی تحمل اسیدیته‌ی محیط (۹/۶-۴ pH) 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 $\text{pH}=4/4$ و $\text{pH}=9/6$ و بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد که ۵۶/۱ درصد از 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 rRNA ۱۶S صورت گرفت، که پس از استخراج DNA ژنومی ناحیه‌ی rRNA ۱۶S آن‌ها با استفاده از واکنش PCR و آغازگرهای عمومی تکثیر شد. مقایسه توالی ناحیه rRNA ۱۶S باکتری‌های این مطالعه با توالی‌های

پایگاه NCBI و با استفاده از نرم‌افزار BLAST نشان داد که بهترین انطباق با توالی ژن rRNA ۱۶S ی متعلق به باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* با ۹۹ درصد همپوشانی اتفاق افتاد. توالی rRNA ۱۶S 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 rRNA ۱۶S سویه‌های جدا شده از شیرهای بلوط با نتایج به دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی کاملاً مطابقت داشتند. همانند نتایج (۵۳)، توالی‌یابی ناحیه‌ی rRNA ۱۶S 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 $\text{pH}=4/4$ 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 *انتروکوکوس*‌ها می‌توانند دارای فعالیت‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک باشند (۵۴). با افزایش روزافزون مقاومت دارویی در *انتروکوکوس*‌ها، اهمیت بررسی فاکتورهای مرتبط با کلونیزاسیون و پاتوژن 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 *انتروکوکوس*‌ها شرکت دارند، هر چند نقش دقیق آن‌ها در عفونت‌زایی نامشخص باقی مانده است (۵۵). سویه‌ای از *انتروکوکوس* به نام *E. faecium SF68* به عنوان پروبیوتیک در سوئیس استفاده شده که اثر کلینیکی مؤثری در جلوگیری از

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.

اسهال دارد و در فرآیند درمان اسهال در کودکان مؤثر شناخته شده است. اخیراً کمیته نظارت بر مواد غذایی در انگلیس استفاده از سویه E. faecium K77D را به عنوان استارتر محصولات لبنی تخمیری تأیید نموده است (۵۶). به علاوه 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

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

- 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, Nejdassattari 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. *Lactobacillus oryzae* 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. *Lactobacillus hokkaidonensis* 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.

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, Schwarzbald 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. New York: 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, Wohlfel 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.

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.