نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۰، پاییز ۱۳۹۷
ص‌ص: ۸۹~۱۰۲

بررسی بی‌ضرری انتروکوک‌های پروبیوتیکی بومی جدا شده از محصولات شیری و شیر انسان با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی

- **مهزاد خطیبی**
کارشناس ارشد میکروبیولوژی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- **نرگس واسجی**
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات،آموزش و کشاورزی،کرج
- **بهزاد صالحی**
عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
- **ناهید مژگانی**(نویسنده مسئول)
عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات واکسن و سرمسازی رازی، سازمان تحقیقات،آموزش و کشاورزی،کرج

تاریخ دریافت : مرداد ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۱۶۴۶۰۶۳
Email: dnmoj@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2017.114810.1498

چکیده

انتروکوکوس‌ها **نقش مهمی در صنایع مختلف دارند. بعضی از *انتروکوکسی‌ها* نیز با منشاء لبنیات و شیر مادر به عنوان پروبیوتیک گزارش شده‌اند. هدف از این مطالعه، تعیین بی‌ضرری و ایمنی گونه‌های *انتروکوک* جدا شده از شیر بز، پنیر سنتی و نمونه‌های شیر مادر بود. نمونه‌های *انتروکوکوس* جدا شده به وسیله ویژگی‌های فنوتیپی و تعیین توالی** 16srRNA **تا سطح جنس شناسایی شدند و خواص پروبیوتیکی آن‌ها، زنده مانی در شرایط اسیدی و حضور در درصدهای مختلف نمک صفراوی در زمان‌های مختلف بررسی گردید. فعالیت ضد میکروبی این باکتری‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا و مقاومت آن‌ها نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها نیز ارزیابی شد. جهت بررسی بی‌ضرری *انتروکوکوک‌های* شناسایی شده، حضور یا عدم حضور تعدادی از ژن‌های ویرولانس(*asa1, hyl, esp, agg, gelE, cylA, cylB, cylM, efaAfm, efaAfs*) و مقاومت به ونکومایسین (*vanA, vanH, vanR , vanY*) با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی سنجیده شد. مقاومت فنوتیپی *انتروکوک‌های* انتخاب شده در برابر لیپاز،** DNase **و همولیز گلبول‌های قرمز نیز تعیین گردید. نتایج این تحقیق خصوصیات پروبیوتیکی بعضی از این گونه ها را مشخص کرد. ٤ جدایه تحمل اسید و نمک صفرا را نشان دادند و اثرات ضد میکروبی چشمگیری داشتند. تمامی سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از شیر مادر فاقد ژن‌های ویرولانس بودند. در آزمایشات فنوتیپی ویرولانس در سویه‌ها، همه سویه‌ها از نظر فعالیت همولیزی آلفاهمولیتیک بودند. همه سویه‌ها به تتراسایکلین، سفالوتین، آموکسی سیلین، سفازولین و داکسی سایکلین حساسیت نشان دادند و همه آن‌ها به جز سویه** TA00154**، نسبت به نالیدیکسیک اسید و تری متوپریم سولفامتاکسازول، مقاوم بودند.**

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، انتروکوکوس، **srRNA**۱۶، ژن‌های ویرولانس، مقاومت ونکومایسین

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

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

1:Mahzad Khatibi, MSc student Microbiology Department, Islamic Azad University, Karaj Branch-Iran
2:Narges Vaseji, Member of scientific board, Dept. Of Biotechnology, Animal Science Research
Institute of Iran (ASRI), Shahid Beheshti St.,Karaj, Iran.
3:Behzad Salehi, Member of scientific board, Islamic Azad University, Karaj Branch-Iran
4*:Naheed Mojgani, Associate professor, Biotechnology Dept, Razi Vaccine and Serum Research Institute- Agriculture research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran

Received: July 2017 **Accepted: December 2017**

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

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

مقدمه

در چند دهه اخیر باکتری‌های اسید لاکتیک[1] به دلیل عملکرد مهم خود در صنایع غذایی و توانایی تخمیر به خوبی شناخته شده‌اند. این باکتری‌های گرم مثبت نقش مهمی در اکوسیستم روده ایفا می‌کنند(Lin and Chan، ۲۰۰۰) و از جمله مهم‌ترین باکتری-های پروبیوتیکی به حساب می‌آیند که با کلونیزه شدن در روده، مانع از رشد باکتری‌های مضر، به وسیله مکانیسم‌های حذف رقابتی، تولید اسیدهای آلی و ترکیبات ضد میکروبی می‌شوند. واژه پروبیوتیک از دو کلمه یونانی " پرو " و " بیوتیک " به معنی " برای حیات " منشاء گرفته و در تضاد با واژه آنتی بیوتیک به معنی ضد حیات می باشد. از طرفی دیگر، پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌هایی که رشد میکروارگانیسم‌های دیگر را افزایش می‌دهند، نیز تعریف شده اند(Holzapfel و همکاران،۲۰۰۱) . در حال حاضر، نقش این باکتری‌ها در سلامت و عملکرد روده انسان و دام، عمدتاً به دلیل توانایی رشد در pH پایین و تولید عوامل ضد میکروبی به خوبی مورد تایید قرار گرفته است (Moreno و همکاران،۲۰۰۶). به همین ترتیب، پتانسیل آنتی-

[1] - Lactic Acid Bacteria(LAB)

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

امروزه *انتروکوک‌ها*، دومین علت اصلی عفونت‌های دستگاه ادراری و سومین علت اصلی باکتریمی بیمارستانی نیز شناخته می-شوند(Rahimi و همکاران،۲۰۰۷). اکثر عفونت‌های *انتروکوکی* انسان به وسیله *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* ایجاد می‌شوند. همچنین تعداد کمی از موارد عفونت‌های انسانی به وسیله گونه‌های دیگر *انتروکوک* مانند *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس گالیناروم* و *انتروکوکوس کاسلی‌فلاووس* گزارش شده است(Rahimi و همکاران،۲۰۰۷). *انتروکوکوس فاسیوم* باکتریوسین‌هایی تولید می‌کند که باکتری‌هایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند و همچنین پاتوژن‌های روده‌ای را مهار می‌کند. برخی از *انتروکوک‌ها* مانند *انتروکوکوس فاسیوم*(Ryan and Ray ، ۲۰۰۴) دارای خواص مفید بیوتکنولوژیکی و کاربردی از جمله فعالیت آنتی لیستریایی می‌باشند(Kıvanç و همکاران،۲۰۱۶). هدف از این تحقیق، تعیین بی‌ضرری نمونه‌های بومی *انتروکوکوس* جدا شده از منابع مختلف (پنیر سنتی، شیر مادر و شیر بز)با آزمایشات بیوشیمیائی و مولکولی بود و خواص پروبیوتیکی آن‌ها مانند اثر ضد میکروبی، تحمل اسید و صفرا و ... مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها، محیط و شرایط رشد

در این مطالعه، از ۲۴ نمونه بومی *انتروکوکوس* که از شیر بز، پنیر سنتی و شیر مادر (با اجرای طرح‌های تحقیقاتی مختلف در سال-های گذشته جداسازی شده بودند)، استفاده شد. جهت کشت و رشد باکتری‌های اسیدلاکتیکی از محیط MRS[2] و از محیط BHI[3] جهت کشت و رشد گونه‌های بیماری زا در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت تحت شرایط هوازی استفاده شد. برای نگهداری طولانی مدت این باکتری‌ها، کشت تازه در محیط مایع با ۱۵٪ گلیسرول در فریزر C ۲۰°- قرار داده شد.

شناسایی بیوشیمیایی جدایه‌ها

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

شناسایی مولکولی باکتری‌های اسید لاکتیک منتخب

نمونه‌هائی که کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی بوده و الگوی تخمیر قندآن‌ها نزدیک *به انتروکوکوک‌ها* بود، با استفاده از تعیین توالی ناحیه 16SrRNAدر حد جنس شناسایی شدند. استخراج DNA هر نمونه با استفاده از کیت استخراج DNA (شرکت سیناژن، ایران) انجام شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده عبارت بودند از (Jiangو همکاران،۲۰۰۶):

27 F(5'-
AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
1492R(5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3')

محصول PCR بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز مشاهده شد و باند bp ۱۵۰۰ متعلق به جنس اسید لاکتیک بود. سپس باندهای به دست آمده پس از تخلیص جهت تعیین سکانس به شرکت 1st base مالزی فرستاده شدند. تمامی سکانس‌های به

[1]- DeMan Rogosa and Sharpe
[3] - Brain Heart Infusion

دست آمده با برنامه Blast[4] در حد گونه شناسایی و ثبت شدند.بررسی خصوصیات پروبیوتیکی *انتروکوک‌ها*

بررسی مقاومت به اسید

به منظور بررسی مقاومت باکتری‌های منتخب به اسید، از محیط مایع MRS استریل که به کمک اسیدکلریدریک[5] ۱۰نرمال و سود[6] ۱۰ نرمال، pH آن به ترتیب به ۶/۵، ۴، ۳، ۲/۵، ۲ رسانده شده بود، استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های تازه کشت شده به این محیط انتقال و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری و در زمان‌های ۰، ۱، ۲، ۳ و ۴ساعت رشد باکتری‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد(Al-Saleh و همکاران، ۲۰۰۶ ; Başyiğit و همکاران، ۲۰۰۶).

بررسی مقاومت به نمک صفرا

۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های تازه رشد کرده به محیط‌های MRS مایع حاوی ۰/۳، ۰/۷، ۱ درصد نمک صفرای استریل، اضافه شد. سپس رشد باکتری‌ها در زمان ۰، ۲، ۴، ۸، ۲۴ ساعت به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت و سپس ضریب بازدارندگی نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیرمحاسبه گردید(Al-Saleh و همکاران، ۲۰۰۶ ; Başyiğit و همکاران، ۲۰۰۶).

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

بررسی اثر ضدمیکروبی سویه‌های منتخب بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا

اثر ضد میکروبی باکتری‌های منتخب، بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا شامل :سالمونلا تیفی(بومی)[7]،سودوموناس آئروژینوز (RTCC1483)[8]، کلبسیلا پنومونیا(RTCC1254)[9]، اشریشیا کولای(RTCC1174)[10]، استافیلوکوکوس اورئوس(RTCC1240)[11] و با استفاده از روش حفره‌ای سنجیده شد. این روش یکی از معمول‌ترین روش‌های مورد استفاده به منظور تشخیص فعالیت ضدمیکروبی است. در این روش باکتری پاتوژن مورد بررسی به میزان۱۰۰ میکرولیتردرون محیط BHI آگارو MRS آگار ۱٪ اضافه می شود و پس از ریختن درون پلیت، حفراتی درون آن ایجاد می شود. سپس باکتری مورد نظر به میزان ۱۰ میکرولیتر درون حفرات ایجاد شده اضافه می شود. (Todorov and Dicks ، ۲۰۰۵).

بررسی حساسیت *انتروکوک‌ها* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها

مقاومت باکتری‌های منتخب نسبت به ۱۷ نوع آنتی بیوتیک انتخاب شده با روش انتشار دیسک[12] بررسی شد(and Brit Robinson ، ۲۰۰۸). آنتی بیوتیک‌های انتخابی شامل، سفازولین(۳۰ µg) ، داکسی سایکلین (۳۰ µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ µg)، انروفلوکساسین(۱۵ µg)، سفالوتین (۳۰ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، اگزالین (۱ µg)، آموکسی سیلین(۲۵ µg)، سفالکسین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، آمپی-سیلین(۱۰ µg) وانکومایسین (۳۰ µg)، تتراسایکلین (۳۰ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، پنی‌سیلین (۱۰ µg)، کلیندامایسین (۲ µg) و اریترومایسین (۱۵ µg) بود. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه گیری شد.

بررسی فنوتیپی ویرولانس در *انتروکوک های* منتخب با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی

سویه‌های منتخب از نظر فنوتیپی جهت بررسی حضور یا عدم حضور ویرولانسی با استفاده از آزمایش‌های ،همولایزین، هیدرولیزDNA ، هیالورونیداز و تولید لیپاز، لسیتیناز و کواگولاز (Moraes و همکاران،۲۰۱۲; Rabbani و همکاران،۲۰۱۵; Eaton and Gasson، ۲۰۰۱; Franz و همکاران، ۲۰۰۱; Anderson and Gilliland، ۱۹۹۹) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی ژن‌های ویرولانس در انتروکوک‌های جدا شده

پس از بررسی فنوتیپی ژن‌های ویرولانسی در نمونه‌ها با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی، ژن‌های ویرولانسی با استفاده از روش‌های مولکولی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و پرایمرهای اختصاصی (Specific) مربوطه(Vankerckhoven و همکاران، ۲۰۰۴)بررسی شدند.

[4] - Nucleotide blast: Basic Local aligment search tool
[5] - HCL
[6] - NaOH
[7] - *Salmonella typhi*
[8] - *Pseudomonas aeruginosa* (RTCC1483)
[9] - *Klebsiella pneumonia* (RTCC1254)
[10] - *Escherichia coli* (RTCC1174)
[11] - *Staphylococcus aureus*(RTCC1240)
[12] - *disk diffusion*

جدول ۱- پرایمرهای مربوط به ژن‌های ویرولانسی

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

بررسی ژن‌های مقاومت به ونکومایسین

ژن‌های مقاومت به ونکومایسین در سویه‌های منتخب مورد بررسی، طبق روش‌های ذکر شده توسط محققین دیگر (Kos VN و همکاران، ۲۰۱۲; Miele و همکاران،۱۹۹۵) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و پرایمرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. ژن های مورد بررسی و مشخصات آن‌ها در جدول ۲ ذکر شده است.

جدول ۲- لیست پرایمرهای مربوط به ژن‌های مقاومت به ونکومایسین

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

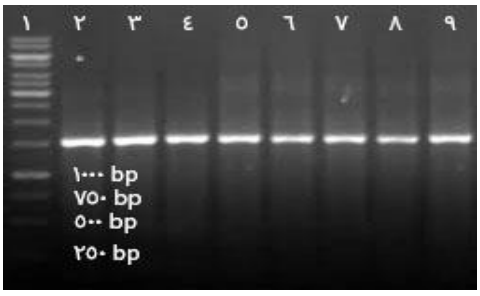
نتایج

پس از انجام کشت و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و مورفولوژیک، ۸ نمونه باکتری اسیدلاکتیک که کوکسی و کوکوباسیل های گرم مثبت، کاتالاز منفی و آلفا همولیتیک بودند جهت مطالعات بعدی انتخاب شدند.

همه نمونه‌های منتخب، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 16SrRNA و با استفاده از پرایمرهای عمومی 27F و 1492R، باندی به اندازه bp ۱۵۰۰ ایجاد کردند(شکل ۱). پس از تعیین توالی و با استفاده از ابزار BLAST blast.ncbi.nim.nih.gov ، نمونه‌ها در حد گونه شناسایی شدند. طبق نتایج به دست آمده تمامی نمونه‌ها دارای مشابهت بین ۹۹-۹۸ درصد به انتروکوک فاسیوم، فکالیس، هومنیس، موندتی، دورانس و هایره بودند.

جدول۳ – باکتری‌های شناسایی شده پس از تعیین توالی

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



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

در طی بررسی تحمل به اسید و نمک صفرا مشخص شد که جدایه‌های TA007, TA0012, TA0059 و TA00166 در pHهای مختلف در مدت ۴ ساعت توانایی زنده ماندن در محیط اسیدی را داشته و در این مدت افزایش رشد چشمگیری داشتند. جدایه TA0033 در زمان‌های ۱ ساعت و ۲ ساعت در pH ۴ ، ۲/۵و ۲ کاهش رشد داشته و در pH ۳ و ۶/۵ به میزان

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

در بررسی فعالیت ضد میکروبی تمامی جدایه‌ها بر علیه ۵ پاتوژن، هر ۸ نمونه قابلیت و توانایی مهار عوامل بیماری زایی مورد بررسی را داشته و حتی مایع رویی کشت آن‌ها نیز مانع رشد این عوامل شد. تمامی نمونه‌ها مانع رشد و فعالیت پاتوژن‌های *سالمونلا تیفی*، *انتروکوکوس فیکالیس*، *اشرشیا کلی* و *لیستریا مونوسایتوژنز* بودند، اما بر روی پاتوژن *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* تنها دو نمونه TA007 و TA00166 قدرت مهار کنندگی را نشان دادند. نمونه TA0033 برعلیه سویه *لیستریا مونوسایتوژنز* و *استرپتوکوکوس آگالاکتیه* و نمونه TA0012 نیز برعلیه *انتروکوکوس فکالیس* اثر مهاری نداشتند.

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

مقاومت فنوتیپی مارکرها در سویه های انتروکوکسی انتخابی: NA (Nalidixic Acid); CHL (Chloramphenicol); G (penicillin); ERY (erythromycin). مقاومت ژنوتیپی به ونکومایسین توسط ژن *VAN* ایجاد میگردد

نتایج آزمایش های بیوشیمیایی جهت ارزیابی ویرولانس در نمونه های مذکور در جدول زیر نشان داده شده است.

جدول ٤- مقاومت فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های انتروکوکوک به آنتی بیوتیک های رایج

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

جدول۵- نتایج آزمون های بیوشیمیایی بی ضرری انتروکوک¬های انتخابی

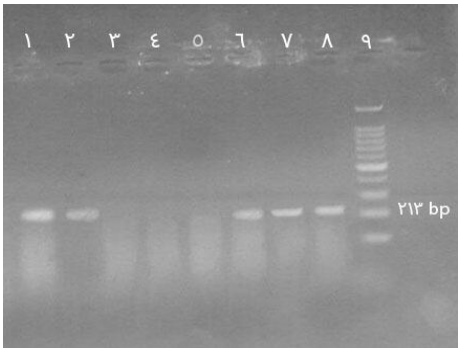
منبع	نمونه ها	سویه شناسایی شده	همولیز	هیدرولیز ژلاتین	لیپاز	هیالورونیداز	DNase
شیر بز	TA007	انتروکوکوس فاسیوم	–	+	–	–	–
پنیر لیقوان سنتی	TA0012	انتروکوکوس فکالیس	–	+	–	–	–
شیر مادر	TA0033	انتروکوکوس فاسیوم	–	–	–	–	–
شیر مادر	TA0059	انتروکوکوس	–	–	–	–	–
پنیر سنتی تبریز	TA00152	انتروکوکوس فاسیوم	–	+	–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

جدول٦- بررسی مولکولی ویرولانس موجود در سویه های انتروکوک

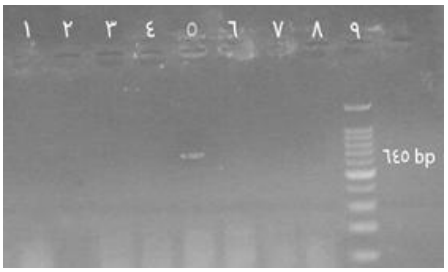
منبع	نمونه ها	سویه شناسایی شده	agg	hyl	esp	gelE	asa1	cylA	cylB	cylM	efaAfs	efaAfm
شیر بز	TA007	انتروکوکوس فاسیوم	–	–	–	+	+	-	-	-	-	+
پنیر لیقوان سنتی	TA0012	انتروکوکوس فکالیس	–	–	–	+	+	-	-	-	+	+
شیر مادر	TA0033	انتروکوکوس فاسیوم	–	–	–	–	–	-	-	-	-	+
شیر مادر	TA0059	انتروکوکوس هومنیس	–	-	–	–	–	-	-	-	-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

ژن‌های ویرولانسی سویه‌ها و همچنین ژن مقاومت به ونکومایسین با استفاده از روش‌های ژنوتیپی بررسی شدند و بی ضرری سویه-های مورد نظر تایید گردید.

همانطور که مشاهده شد، گونه های انترکوکوک جدا شده از شیر مادر فاقد ژن های ویرولانس بوده و تنها ژن *efaAfm* در آنها مشاهد شد. حضور ژن‌های کدکننده مواد تجمعی(asa1)، فعال کننده سیتولیزین (cylA/M/B)، پروتئین سطحی (esp)، هیدرولیز ژلاتیناز(gelE)، پروتئین باند شونده کلاژن(ace)، آنتی ژن اندوکاردیت (efaA) و agg (کد کننده مواد تجمعی) و غیره با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج این بررسی نشان دادند که تمامی سویه‌ها فاقد ژن‌هایefaAfs , agg, hyl, esp, cylA/M/B بودند و و تنها سویه TA00154 فاقد ژن efaAfm (شکل۲) بودند.را داشتند. سویه‌های TA00033 TA0059, TA00152 فاقد ژن gelE (شکل ۳) بودند. در بررسی ژن مقاومت به ونکومایسین ۴ ژن، VAN Y ,VAN R VANA و VAN H مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان دادند تنها سویه TA00152 دارای ژن‌های VAN H و VAN R و سویه TA00177 نیز ژن VAN A را دارا می باشند. همچنین تمامی سویه‌ها فاقد ژن VAN Y بودند(شکل۴) .



شکل ۳- الگوی PCR برای بررسی ژن gelE. ۱.انتروکوکوس فاسیوم (TA007) ۲.انتروکوکوس فکالیس (TA0012) ۳.انتروکوکوس فاسیوم (TA0033) ۴.انتروکوکوس (TA0059) ۵.انتروکوکوس فاسیوم (TA00152) ۶.انتروکوکوس موندیتی (TA00154) ۷.انتروکوکوس دورانس (TA00166) ۸.انتروکوکوس هایره (TA00177) ۹.مارکر 100bp



شکل۴- الگوی PCR با پرایمر VANR,VANR1 (راست) ، با پرایمر VANH,VANH1 (چپ)

بحث

هر چند که *انتروکوک* در تعداد زیادی از محصولات تخمیری حضور دارند، اما کاربرد آن‌ها به عنوان پروبیوتیک هنوز هم با توجه به جنس‌ها و گونه‌های بیماری زا مورد بحث می باشد.(Shankarو همکاران،۱۹۹۹ ;Heikens و همکاران،۲۰۰۷ ;Conde-Estévezو همکاران،۲۰۱۰;Rasmussen و همکاران،۲۰۱۰)

بسیاری از گونه‌های *انتروکوک* به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها و ژن-های بیماری‌زایی مانند چسبندگی و همولیزین مقاوم هستند و

اغلب این ژن‌ها روی پلاسمید قرار دارند که می‌توانند به سویه‌های درونی در دستگاه گوارش انسان منتقل شده و به افزایش بیماری-زایی فاکتورهای ویرولانسی در این گونه‌ها و سویه‌های درون زا کمک کنند. بنابراین، ایمنی گونه‌های *انتروکوکی* مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک باید ابتدا بررسی شده و سپس از مزایای استفاده این گونه‌های جدید از نظر سود یا زیان نیز مطمئن شویم(Araújo and Ferreira،۲۰۱۳).

با توجه به مطالعات قبلی که بر روی مجموعه *انتروکوک‌های* جدا شده از منابع مختلف صورت گرفته بود، داده‌های حاصل از بررسی مقاومت به اسید و نمک صفراوی، در شرایط شبیه سازی شده معده – روده‌ای این پژوهش نشان دادند که حدود ۹۵٪ از ایزوله‌های مورد بررسی دارای مقاومت به اسید و نمک صفرا بوده و از میان آن‌ها ۸۷/۵ ٪ از ایزوله‌ها توانایی رشد و زنده مانی در pH های کمتر از ۴ و نمک صفرای حتی تا ۱٪ را داشتند که در این بین سویه TA00166 (*انتروکوکوس دورانس*) بالاترین میزان رشد و مقاومت را از خود نشان داد. همانند این پژوهش که توسط Pienis و همکارانش صورت گرفت، توانایی زنده ماندن انتروکوک دورانس LAB18s در برابر شرایط اسیدی، شیره معده شبیه سازی شده در ۳ و موکوس روده‌ای شبیه سازی شده در حضور یا عدم حضور نمک‌های صفراوی نشان داده شده است. نشان داد که *انتروکوکوس فاسیوم* تنها توانایی تحمل به نمک صفرا تا غلظت ۰/۰۵ درصد و۳/۲ pH را تا ۱۵ ثانیه اول داشت دارند و در ۱۵ ثانیه دوم (۳۰ثانیه) میزان رشد و زنده‌مانی آن‌ها تغییری نیافته است. باکتری‌های پروبیوتیک برای تاثیر بر فلور میکروبی روده باید با پاتوژن‌ها از طریق تولید مواد ضد میکروبی یا رقابت با آن‌ها مقابله داشته باشند(Flahaut و همکاران،۱۹۹۶) .

در تحقیق دیگر، با بررسی اثر ضد میکروبی بر روی سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* نشان دادند، سویه‌های مورد بررسی با ایجاد بیشترین قطر هاله (۱۰/۵ میلی‌متر) بر روی پاتوژن *سالمونلا انتریدیدیس* اثر مهاری داشتند(Hafsa و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه‌ای، اثر مهاری باکتری‌های انتروکوک را بر علیه پاتوژن‌های *لیستریا اینوکوآ، لیستریا مونوسایتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا انتریتیدیس، اشرشیا کلی* مورد بررسی قرار دادند و همانند این بررسی، بیشترین اثر مهاری را بر روی سویه‌های *انتروکوکوس فیکالیس(۵۵٪)، لیستریا مونوسیتوژنز(۳۰٪)* و *استافیلوکوکوس اورئوس (۲۳۸٪)* مشاهده کردند(Ogakiو همکاران ، ۲۰۱۶). یکی از الزامات ایمنی برای باکتری‌های زنده که توسط انسان‌ها مصرف می شوند، عدم وجود هرگونه مقاومت اکتسابی آنتی بیوتیک‌ها و فاکتورهای ویرولانسی در آن‌ها می باشد. بنابراین، آنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی و عدم وجود ژن‌های ویرولانسی در سویه‌های پروبیوتیک حائز اهمیت است که یکی از ویژگی‌های فنوتیپی از یک گونه می باشد(Hong و همکاران،۲۰۰۹) . بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی در سویه‌های مورد مطالعه، بر روی ۱۷ نوع آنتی بیوتیک متداول مشخص کرد که همگی به نالیدیکسیک اسید، تری متوپریم و سولفامتاکسازول مقاوم و نسبت به مابقی آنتی بیوتیک ها حساسیت داشتند. در صورتی که برخلاف این نتایج گزارش شد که اکثر سویه‌های *انتروکوک* مورد بررسی نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها مقاوم بودند(Iweriebor و همکاران، ۲۰۱۵). گونه‌های *انتروکوک* دارای ژن‌های ویرولانسی (asa1، hyl، esp، agg، gelE، cylA، cylB، cylM، efaAfm، efaAfs) مختلف هستند که عامل اصلی بیماری‌زایی در آن‌ها می‌باشند. چند ژن ویرولانس مهم *انتروکوک‌های* مورد بررسی در این تحقیق نشان دهنده اکثر سویه‌های مورد آزمایش بود. همانند این بررسی، در پژوهشی تمامی سویه‌های مورد بررسی فاقد ژن‌های esp, agg cylAMB و hyl بوده و برخی حامل یک یا چند ژن ویررولانسی بودندکه مشخص شد ۶۲/۵٪ از تمامی سویه‌ها حامل gelE (فعالیت هیدرولیز ژلاتین) بوده که به طور کامل (۱۰۰٪)، هر ۸ سویه به صورت فنوتیپی این فعالیت را نشان دادند(Paulsen و همکاران، ۲۰۰۳). بنابراین، حضور یک ژن خاص به طور معمول به معنی بیان فنوتیپی آن نمی باشدکه نشان می‌دهد وجود ژن خاموش و بیان ژن gelE بستگی به شرایط محیطی و وضعیت کشت دارد. این بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی نیاز به ایمنی سویه‌های *انتروکوکوس* دارد(Duprèو همکاران،۲۰۰۳). همانند نتایج به دست آمده در این مطالعه که هیچ یک از سویه‌ها دارای ژن hyl نبودند، در مطالعه‌ای بیان کردند، سویه‌های انتروکوک، در طی بررسی ژن‌های ویرولانسی حامل ژن hyl نیستند(Billström و همکاران، ۲۰۰۸). این نتایج

متضاد با نتایج به دست آمده از مطالعات Vankerckhoven و همکارانش در سال ۲۰۰۴ بودکه حضور ژن hyl را در ۱۷٪ از ۲۷۱ نمونه *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از ۸ کشور اروپایی مشاهده کردند و نیز Rice و همکارانش (۲۰۰۳) که آن‌ها نیز بیان کردند، ژن hyl تنها در ۳٪ نمونه‌های اروپایی وجود دارد. با توجه به یافته‌های محققان دیگر(Eaton and Gasson،۲۰۰۱و۲۰۰۲)، ژن esp در ۸۰٪ نمونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* مشاهده شد که در نقطه مقابل با یافته‌های شانکار و همکارانش (۱۹۹۹) نیز می باشد، که عدم وجود ژن esp را در سویه *انتروکوک فاسیوم* گزارش دادند(Shankar و همکاران،۱۹۹۹). در این بررسی هیچ یک از سویه‌های *انتروکوک* حامل ژن esp نبودند. در این مطالعه تمامی سویه‌های *انتروکوک* مورد بررسی فاقد ژن‌های cylABM بودند که مشابه با نتایج و Eaton همکارانش می‌باشد(Eaton and Gasson،۲۰۰۱) و با نتایج گزارش شده توسط دیگر محققان برای حضور یک یا بیشتر این ژن‌ها مغایرت دارد. همچنین، ۵۰ ٪ از سویه‌های انتروکوک در این مطالعه دارای ژن asa1 بودند. گروهی از محققان نیز در ۶۳/۵٪ از نمونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* که بیشتر به عفونت‌های غیر تهاجمی مربوط می شود، این ژن را نشان دادند(Creti و همکاران،۲۰۰۴) . مشابه این مطالعه، گروهی، یک ایزوله *انتروکوک فاسیوم* gelE مثبت را بدون داشتن فعالیت فنوتیپی ژلاتیناز(Eaton و همکاران،۲۰۰۱) وگروهی دیگر، ۱۳٪ ایزوله-های *انتروکوکوس فاسیوم* بالینی دارای ژن asa1 راپیدا کردند(Elsner و همکاران،۲۰۰۰). در این پژوهش، ژن کد کننده efaAfs در تمامی نمونه‌ها به جز نمونه TA00154 (*انتروکوکوس موندتی*)مشاهده شد. ژن efaA با توجه به مطالعات قبلی در سویه *انتروکوکوس فیکالیس* یافت شد. در طی بررسی ژن ویرولانسی agg مشخص شد که هیچ کدام از سویه-های مورد بررسی حامل ژن agg (کد کننده مواد تجمعی) نبوده و در صورتی که برخلاف این نتایج در تحقیقی نشان دادند که ۷۳/۳٪ از سویه‌های *انتروکوک* دارای این ژن بودند(Jimenez و همکاران،۲۰۱۳). سویه‌های *انتروکوکوس* از نظر داشتن ژن مقاومت به ونکومایسین نیز بررسی شدند. *انتروکوک‌ها* به گلیکوپپتیدها درسطح بالایی مقاوم بودند و یک مقاومت سینرژیسمی بین عوامل دیواره سلولی در مقابل (آمپی سیلین، پنی سیلین، ونکومایسین) و آمینوگلیکوزیدها وجود دارد. اکثر سویه‌ها حامل ژن‌های مقاومت به ونکومایسین نبودند و تنها سویه TA00152 حامل vanH و vanR بود. در مطالعه‌ای، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی از میان نمونه‌های *انتروکوک*، ۱۷ نمونه مقاوم به vanA، ۷ نمونه به vanB و ۶ نمونه مقاوم به vanC را در میان سویه‌های *انتروکوک* جدا شده از منابع مختلف مورد بررسی قرار دادند. از آن‌جایی که درجه بالایی از همولوژی حدود ۷۴٪ بین vanA و vanB وجود دارد، مهم است که پرایمرها بر اساس این قسمت ژن ها طراحی شوند(Mieleو همکاران،۱۹۹۵). *انترکوکوس فاسیوم TA0033* جدا شده از شیر انسان کاملا فاقد شاخصهای ویرولانس بود و هیچیک از ویژگی های ویرولانس فنوتیپی و ژنوتیپی در این سویه مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری

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

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

منابع

Al-Saleh A , Metwalli A. M and Abu-Tarboush H. M.(2006). Bile salts and acid tolerance and cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and *bifidobacteria*. *Journal of the Saudi Society of food and nutrition.* **1**: 1-16.

Anderson, J. W. and S. E. Gilliland .(1999). Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilu*s L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition* .18(1): 43-50.

Araújo, T. F. and C. L. d. L. F. Ferreira .(2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian archives of biology and technology* .56(3): 457-466.

Başyiğit G, Kuleaşan H, Karahan AG. (2006).Viability of human-derived probiotic *lactobacilli* in ice cream produced with sucrose and aspartame. *Journal of industrial microbiology & biotechnology***.** 33(9): 796-800.

Bhardwaj A, Kaur G, Gupta H, Vij S, Malik R.(2011). Interspecies diversity, safety and probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* isolated from dairy food and human faeces. *World Journal of Microbiology and Biotechnology***.** 27(3): 591-602.

Billström H, Lund B, Sullivan A, Nord CE. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International journal of antimicrobial agents*. 32(5): 374-377.

Britz, T. and R. K. Robinson.(2008). *Advanced dairy science and technology*, John Wiley & Sons. the trusted publisher of academic, scientific, and professional books since 1807.

Buntin,N,Chanthachum,Sand ongpattarakere,T (2008). Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science & Technology***.** 30 (Suppl.1), 141-148.

Conde-Estévez D, Sorli L, José Antonio Morales-Molina J.A, Knobel H, Terradas R, Mateu-de Antonio J, Horcajada J.P, Grau S. (2010). Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(6): 342-348..

Creti R, Imperi M, Bertuccini L, Fabretti F, Orefici G, Di Rosa R, Baldassarri L.(2004). Survey for virulence determinants among *Enterococcus faecalis* isolated from different sources. *Journal of Medical Microbiology.* 53(1):13-20.

Duprè I , Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. (2003). Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiology*. 52(6): 491-498.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:24–27.

Eaton, T. J. and M. J. Gasson .(2001).Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*. 67(4): 1628-1635.

Eaton, T. J. and M. J. Gasson .(2002). A variant *enterococcal* surface protein Espfm in *Enterococcus faecium* ;distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS microbiology letters* .216(2): 269-275.

Elsner HA, Sobottka I, Mack D, Claussen M, Laufs R, Wirth R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases***.** 19(1): 39-42.

Flahaut, S., et al. (1996). Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS microbiology letters*. 138(1): 49-54.

Franz C.M, Muscholl-Silberhorn A.B, Yousif N.M.K, Vancanneyt M, Swings J and Holzapfel W.H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4385-4389.

Giraffa, G. (2003). Functionality of *enterococci* in dairy products. *International journal of food microbiology*. 88(2): 215-222.

Hafsa S. H, Mendonca A, Brehm-Stecher B, Hassan A. A, Ibrahim S. A. (2015). Probiotic Potential and Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* Isolated from Chicken Caecal and Fecal Samples. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering.* 9(4): 359-363.

Heikens E, Bonten MJ, Willems RJ. (2007). *Enterococcal* surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *Journal of bacteriology*. 189(22): 8233-8240.

Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U.(2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition*. 73(2):365s-73s.

. (2009). Bacillus subtilis isolated from the human gastrointestinal tract. *Research in microbiology*. 160(2):134-43.Iweriebor BC, Gaqavu S, Obi LC, Nwodo UU, Okoh AI. (2015). Antibiotic susceptibilities of *Enterococcus* species isolated from hospital and domestic wastewater effluents in Alice, eastern cape province of South Africa. *International journal of environmental research and public health*. 12(4): 4231-4246.

Jiang H, Dong H, Zhang G, Yu B, Chapman LR, Fields MW. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and environmental microbiology***.** 72(6): 3832-3845.

Jiménez E, Ladero V, Chico I, Maldonado-Barragán A, López M, Martín V, Fernández L, Fernández M, Álvarez MA, Torres C, Rodríguez JM. (2013). Antibiotic resistance, virulence determinants and production of biogenic amines among *enterococci* from ovine, feline, canine, porcine and human milk. *BMC microbiology***.** 13(1): 1.

Kıvanç SA, Kıvanç M, Yiğit T. (2016). Antibiotic susceptibility, antibacterial activity and characterisation of *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. *Experimental and therapeutic medicine* .12(3): 1732-1740

Kos V. N, Desjardins C.A, Griggs A, Cerqueira G, Van Tonder A, Holden M.T.G, Godfrey P, Palmer K.L, Bodi K, Mongodin E.F, Wortman J, Feldgarden M, Lawley T, Gill S.R, Haas B.J, Birren B, Gilmore M.S.(2012). Comparative genomics of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and their positions within the clade most commonly associated with Methicillin-resistant *S. aureus* hospital-acquired infection in the United States. *MBio*(*bimonthly peer-reviewed open access scientific journal*). 3(3): e00112-00112.

Lin, M.-Y. and F.-J. Chang .(2000). Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Digestive diseases and sciences*. 45(8): 1617-1622.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N.(2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* .4(8): 118-26.

Miele A, Bandera M, Goldstein BP. (1995). Use of primers selective for vancomycin resistance genes to determine van genotype in *enterococci* and to study gene

organization in VanA isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 39(8): 1772-1778.

Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva A Jr, Franco BD, Nero LA. (2012). Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese.*Journal of Applied Microbiology*.113:318-328.

Moreno M. F, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. (2006). The role and application of *enterococci* in food and health. *International ournal of food microbiology*. 106(1): 1-24.

Ogaki, M, Rocha KR, Terra MR, Furlaneto MC, Maia LF. (2016). Screening of the enterocin-encoding genes and antimicrobial activity in *Enterococcus* species. *Journal of microbiology and biotechnology*. 28;26(6):1026-34.

Ou C.C, Lu T.M, Tsai J.J, Yen J.H, Chen H.W, Lini M.Y.(2009). Antioxidative Effect of Lactic Acid Bacteria: Intact Cells vsIntracellular Extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*. Vol. 17 Issue 3, p209-216.

Paulsen IT, Banerjei L, Myers GS, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H,Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM.(2003). Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science*. 299(5615): 2071-2074.

Pieniz S, Andreazza R, Anghinoni T, Camargo F, Brandelli A. (2014). Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control* .37: 251-256.

Rabbani M, Shafiee F, Shayegh Z, MirMohammadSadeghi H, Samsam Shariat Z, Etemadifar Z, Moazen F. (2015). Isolation and Characterization of a New Thermoalkalophilic Lipase from Soil Bacteria. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* .14(3): 901-6.

Rahimi F, Talebi M, Saifi M, Pourshafie MR. (2007). Distribution of *enterococcal* species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iranian Biomedical Journal*. 11(3): 161-167.

Rasmussen M, Johansson D, Söbirk SK, Mörgelin M, Shannon O. (2010). Clinical isolates of *Enterococcus faecalis* aggregate human platelets. *Microbes and Infection*. 12(4): 295-301.

Rice LB, Carias L, Rudin S, Vael C, Goossens H, Konstabel C, Klare I, Nallapareddy SR, Huang W, Murray BE.. (2003). A potential virulence gene, hylEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. *Journal of Infectious Diseases*. 187(3): 508-512.

Ryan KJ, Ray CG.(2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 294–5. ISBN: 0-8385-8529-9.

Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. (1999). Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity*. 67(1): 193-200.

Todorov, S. and L. Dicks .(2005). Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 36(2): 318-326.

Vankerckhoven V, Van Autgaerden T, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H.(2004). Development of a multiplex PCR for the detection of asa1, gelE, cylA, esp, and hyl genes in *enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology* .42(10): 4473-4479.