اثر مهاری جدایه‌های بومی انتروکوک بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی

صبا تفکیکی[۱]، شهرام حنیفیان[۲*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: hanifian@iaut.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۷/۱/۲۱ پذیرش نهایی: ۹۷/۲/۱۵)

چکیده

انتروکوکوس‌ها جزو باکتری‌های لاکتیکی هموفرمانتاتیو هستند و به‌طور معمول در شیر خام و فرآورده‌های آن یافت می‌شوند. هدف مطالعه حاضر جداسازی انترکووس‌ها از شیر خام و فرآورده‌های سنتی شیر در منطقه تبریز و مطالعه اثر مهاری گونه‌های انتروکوکوس بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی می‌باشد. برای این منظور ۱۰۵ نمونه (۱۵ عدد از هر یک از نمونه‌های شیر خام، ماست، پنیر، خامه، کره، دوغ و کشک) مورد آزمایش قرار گرفت. پس از جداسازی و شناسایی افتراقی گونه‌ها، ۲٤ جدایه با در نظر گرفتن نوع نمونه و تنوع گونه‌ای انتروکوکوس، انتخاب شدند. با توجه به پتانسیل بیماری‌زایی گونه‌های *فکالیس* و *فاسیوم*، جدایه‌های این دو گونه به‌ترتیب از نظر وجود ژن‌های حدت *Esp* و *Asa1* ارزیابی گردیدند. اثر مهاری جدایه‌های انتروکوکوس با استفاده از روش دولایه (Overlay)، بر ۹ باکتری‌های مهم بیماری‌زای غذایی آزمایش شد. بر اساس نتایج مطالعه، ۹ گونه *فاسیوم*، *فکالیس*، *گالیناروم*، *اویوم*، *ماندتی*، *کازلیفلاووس*، *هایرا*، *ساکارولیتیکوس* و *رافینوسوس* به‌دست آمدند. تمامی جدایه‌ها اثر مهاری بر میکروب‌های شاخص داشتند؛ با این توضیح که اثر مهاری در بین گونه‌های مختلف و هم‌چنین سویه‌های مختلف یک گونه متفاوت برآورد شد. بیشترین اثرات ضدباکتریایی مربوط به گونه‌های انتروکوکوس *فکالیس* و *فاسیوم* بود. ارزیابی مولکولی نشان داد از مجموع ۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس*، ۲ جدایه حاوی ژن حدت *Esp* بودند. در مورد گونه *فاسیوم* ژن حدت *Asa1* در هیچ یک از ٦ جدایه ردیابی نشد. در صورت انجام آزمایش‌های تکمیلی در ارتباط با اثبات ایمن بودن انتروکوکوس‌ها، می‌توان از اثر مهاری آن‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زای غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: انتروکوکوس، شیر خام، فرآورده‌های سنتی شیر، اثر آنتاگونیستی، روش دولایه

مقدمه

انتروکوکوس‌ها یا استرپتوکوک‌های مدفوعی (Enteric streptococci) کوکسی‌های گرم مثبتی هستند که اغلب به‌صورت دوتایی یا زنجیرهای کوتاه دیده می‌شوند. از خصوصیات برجسته انتروکوکوس‌ها می‌توان به تحمل گرما و توانایی رشد در دامنه وسیعی از pH و دما اشاره نمود (Dever and Handwerger, 1996). گونه‌های انتروکوکوس شامل *فکالیس* (*E. faecalis*)، *فاسیوم* (*E. faecium*)، *دورانس* (*E. durans*)، *هایرا* (*E. hirae*)، *گالیناروم* (*E. gallinarum*)، *کازلیفلاووس* (*E. casseliflavus*)، *ماندتی* (*E. mundetii*)، *آویوم* (*E. avium*)، *مالادوراتوس* (*E. maladuratus*)، *سودوآویوم* (*E. pseudoavium*)، *رافینوسوس* (*E. raffinosus*)، *سولفوروسوس* (*E. sulfurosus*) و *ساکارولیتیکوس* (*E. saccharoliticus*) می‌باشند. این گونه‌ها با وجود اشتراک در برخی خصوصیات، دارای ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متفاوت و گاهی منحصر به‌فرد هستند (Manero and Blanch, 1999)؛ در این بین، گونه‌های *فکالیس* و *فاسیوم* شایع‌ترین انواع انترکوکوس محسوب می‌شوند (Giraffa, 2003; Gomes *et al*., 2008).

انتروکوکوس‌ها به‌عنوان بیماری‌زاهای فرصت‌طلب شناخته می‌شوند که در ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های شایع در انسان از جمله آندوکاردیت، باکترمی، مننژیت و سپتی‌سمی نقش دارند. گزارشاتی مبنی بر بروز مقاومت در انتروکوکوس‌های بیماری‌زا به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و محدود شدن روش‌های درمانی مؤثر علیه عفونت‌های انتروکوکی مطرح شده است (Dever and Handwerger, 1996). از طرف دیگر برخی از انتروکوکوس‌ها دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه میکروب‌های بیماری‌زا هستند (Fisher and Phillips, 2009) و اثراتی مشابه پروبیوتیک‌ها دارند (Gomes *et al*., 2008). انتروکوکوس‌ها در بسیاری از مواد غذایی خام و فرآوری شده یافت می‌شوند؛ در این میان شیر و فرآورده‌های آن حاوی انواع متنوعی از گونه‌های این باکتری هستند (Jamet, *et al*., 2012). انتروکوکوس‌ها جزو باکتری‌های مولد اسید لاکتیک دسته‌بندی می‌شوند و به‌همراه لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها به‌عنوان آغازگر در انواع سنتی محصولات تخمیری شیر عمل می‌کنند و با توجه به داشتن خواص پروتئولیتیک و لیپولیتیک در تولید عطر و آروما مؤثر هستند (Sánchez Valenzuela *et al*., 2009; Arribas *et al*., 2011). خواص دوگانه انتروکوکوس‌ها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های مفید یا بیماری‌زاهای فرصت‌طلب، سبب ترغیب محققان به جداسازی آن‌ها از مواد غذایی و مطالعه تأثیر آن‌ها بر سلامت مصرف‌کنندگان یا امکان استفاده به‌عنوان آغازگر در محصولات شیر شده است (Moreno *et al*., 2006; Franz *et al*., 2003). انتروکوکوس‌ها به‌رغم داشتن بسیاری از ویژگی‌های مطلوب باکتری‌های پروبیوتیک، در گروه میکروب‌های GRAS (Generally Recognized As Safe) دسته‌بندی نمی‌شود و حضور آن‌ها در مواد غذایی نشانه‌ای از آلودگی مدفوعی آن‌هاست (Fracalanzza *et al*., 2007; Gomes *et al*., 2008; Nam *et al*., 2009; Mannu *et al*., 2013).

به‌دلیل تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از ترکیبات نگهدارنده طبیعی و روش‌های مبتنی بر حفاظت زیستی

(Biopreservation) بـه‌جای نگهدارنـده‌های شـیمیایی، تحقیقـات گسـترده‌ای در ارتبـاط بـا بررسـی اثـرات ضدمیکروبی سویه‌های بومی در منـاطق مختلـف جهـان در حال انجـام اسـت (Cleveland *et al*., 2001). اکثـر این مطالعات بر روی گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس و لاکتوکوکـوس تمرکـز یافتـه اسـت؛ در حالی‌کـه انـواع متنوعی از انتروکوکوس‌ها با جمعیتی قابـل‌ملاحظـه، در بسیاری از فرآورده‌های تخمیری شـیر گـزارش شـده‌اند (Franz *et al*., 2003). با توجه به این‌که تبریز از مناطق عمده تولید انواع متنوعی از فرآورده‌های تخمیـری شـیر می‌باشد، لذا ارزیابی ویژگی‌های آنتاگونیسـتی گونـه‌های بـومی انتروکوکـوس می‌توانـد بـه شناسـایی ترکیبـات ضدمیکروبی جدید منجر شود. هدف از مطالعـه حاضـر جداسازی انتروکوکوس‌ها از شـیر خـام و فرآورده‌هـای تخمیری سنتی شیر و بررسی اثر مهاری آن‌ها بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای مهم غذایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- روش نمونه‌گیری

در مجمـوع تعـداد ۱۰۵ نمونـه شـامل شـیر خـام و فرآورده‌های سنتی نظیر ماست، دوغ، پنیر، کره، کشک و خامه (از هر نمونه به تعـداد ۱۵ عـدد) از فروشـگاه‌ها و مراکز تولید فرآورده‌های سنتی شیر در تبریز جمـع‌آوری شد و به‌صورت سرد به آزمایشگاه انتقال یافت.

- جداسازی و شناسایی انتروکوکوس‌ها

مقدار ۱۰ گرم (یا میلی‌لیتر) از هر نمونه بـه ارلن‌مـایر حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محـیط کشـت (Merck, Germany) Buffered Peptone Water اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه قرارگیری در بن‌ماری ۳۷ درجـه سلسـیوس، به‌مـدت ۵ دقیقه در شـیکر بـا شـدت ۲۳۰ دور بـر دقیقـه مخلـوط گردید و در دمای ۳۷ درجـه سلسـیوس به‌مـدت ۱۲-۶ سـاعت گرمخانه‌گـذاری شـدند (Fracalanzza *et al*., 2007; Morandi *et al*., 2006). از نمونه غنی شـده در Kanamycin Esculin Azide (Merck, Germany) agar به‌صورت خطی کشـت داده شـد و در دمـای ۴۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گـذاری گردید. متناسب با تنـوع مورفولـوژیکی پرگنـه‌های هـر پلیت، تعداد ۳ تا ۵ پرگنه با قطـر ۲-۱ میلی‌متـر و هالـه سـیاه‌رنگ انتخـاب شـدند. قبـل از انجـام آزمون‌هـای غربال‌گری، جهت خالص‌سازی و احیـای جدایـه‌ها، در محـیط (Merck, Germany) Brain Heart Infusion agar کشت خطـی داده شـدند (Fortina *et al*., 2008; Fracalanzza *et al*., 2007).

بـرای شناسـایی جـنس انتروکوکـوس از آزمون‌هـای مورفولـوژیکی و بیوشـیمیایی نظیـر رنـگ‌آمیزی گـرم، آزمـون کاتـالاز، رشـد در حضـور ۶/۵ درصـد نمـک و توانایی هیدرولیز بایل اسکولین استفاده شد. جدایـه‌های گرم مثبت، کوکسی شـکل (منفـرد، دوتـایی و زنجیـری کوتاه)، کاتالاز منفی، با قابلیت تحمل ۶/۵ درصـد نمـک و هیـدرولیز اسـکولین، بـه‌عنوان جـنس انتروکوکـوس انتخاب شدند و در ادامـه تشـخیص تفریقـی گونـه‌های انتروکوکوس با استفاده از آزمون‌های افتراقـی اسـتاندارد تعیین گردید. آزمون‌های افتراقی شامل توانایی رشـد در دماهای ۱۰ و ۴۵ درجه سلسیوس، تولیـد H_2S، قابلیـت حرکـت، تولیـد رنگدانـه زرد، تولیـد اسـید از قنـدهای تاگـاتوز، سـوربوز، سـوربیتول، ملـی‌زیتـوز، ملـی‌بیـوز، آرابینـوز و گلیسـرول و نیـز هیـدرولیز آرژینـین بودنـد (Fortina *et al*., 2008; Morandi *et al*., 2006).

- ردیابی ژن‌های حدت درگونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم*

با توجه به پتانسیل بیماری‌زایی *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم*، جدایه‌های این دو گونه از نظر وجود ژن‌های حدت ارزیابی شدند. برای ردیابی ژن‌های عامل حدت در جدایه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *فاسیوم* به‌ترتیب از *Esp* (Enterococcal surface protein) و *Asa1* (aggregation substance proteins) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا جدایه‌هایی که با آزمون‌های بیوشیمیایی تشخیص تفریقی داده شده بودند، در محیط کشت Luria-Bertani broth (Merck, Germany) به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت داده شد. استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت باکتری‌های گرم مثبت (Sinaclon, Iran) و طبق دستورالعمل سازنده آن، استخراج شد و غلظت و خلوص DNA (به‌ترتیب با طول موج‌های ۲٦۰ و نسبت ۲٦۰ به ۲۸۰) با نانودراپ (Thermo, USA) تعیین شد. واکنش PCR مطابق با یک روش قبلی و با استفاده از پرایمرهای جدول (۱) انجام گرفت (Vankerckhoven *et al.*, 2004).

جدول (۱)- نام ژن هدف، توالی پرایمر و اندازه محصول PCR

ژن هدف	توالی پرایمرها	اندازه محصول (bp)
Esp	5'-AGATTTCATCTTTGATTCTTGG-3' 3- AATTGATTCTTTAGCATCTGG-5'	۵۱۰
Asa1	5'- GCACGCTATTACGAACTATGA-3' 3'- TAAGAAAGAACATCACCACGA-5'	۳۷۵

- ارزیابی اثر مهاری جدایه‌ها بر روی باکتری‌های غذایی

ارزیابی خاصیت ضدمیکروبی جدایه‌های انتروکوکوس‌ها علیه باکتری‌های شاخص با روش دولایه (Overlay) و مطابق با روشی که قبلاً در مطالعات مشابه مورد استفاده قرار گرفته بود، انجام گرفت (Hockett and Baltrus, 2017). باکتری‌های شاخص مورد مطالعه در تحقیق حاضر شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1784)، *لیستریا مونوسایتوجنز* (PTCC 1783)، *لیستریا ایوانووی* (PTCC 1303)، *باسیلوس سرئوس* (PTCC 1015)، *سالمونلا انتریکا* زیرگونه *انتریکا سرووار تایفی‌موریوم* (PTCC 1709)، *اشریشیا کولای* (PTCC 1399)، *یرسینیا انتروکولیتیکا* (PTCC 1786)، *کلبسیلا نومونیه* (PTCC 1859) و *سودوموناس آیروجینوزا* (PTCC 1074) بودند که از کلسکیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST, Iran) تهیه شدند. برای انجام آزمایش، مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون (با کدورت معادل نیم مک‌فارلند) هر جدایه انتروکوکوس بر روی BHI agar به‌صورت نقطه‌ای (Spot) کشت داده شد و به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس (تا رشد کامل پرگنه) گرمخانه‌گذاری گردید. برای لایه دوم، ۷ میلی‌لیتر محیط کشت BHI soft agar (حاوی ۰/۷ درصد آگار) استفاده شد. برای این کار محیط کشت بعد از اتوکلاو، تا دمای

٤٥ درجه سلسیوس خنک‌سازی شد و با ۷۰ میکرولیتر از کشت ۱۸ تا ٢٤ ساعته هر یک از باکتری‌های شاخص با کدورت معادل نیم مک‌فارلند تلقیح و همگن گردید؛ طوری‌که جمعیت باکتری شاخص در هر میلی‌لیتر از محیط مذاب به حدود cfu 10^8 رسید. پس از افزودن لایه دوم بر روی لایه اول کشت، تا زمان منعقد شدن کامل لایه دوم در دمای تقریبی ۲۰ درجه سلسیوس نگه‌داری گردید. در ادامه محیط‌های کشت به‌مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و قطر هاله عدم رشد در پیرامون پرگنه‌های انتروکوکوس – که نشان‌دهنده میزان اثر بازدارندگی جدایه مربوطه می‌باشد– با کولیس اندازه‌گیری گردید (Balouiri *et al.*, 2016; Hockett and Baltrus, 2017). آزمایش تعیین اثر مهاری جدایه‌ها بر روی هر یک از باکتری‌های شاخص سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله عدم رشد، به‌عنوان عدد نهایی ثبت گردید.

– تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار آماری (SPSS Version 20) انجام گرفت. ابتدا آمار توصیفی (میانگین و خطای معیار سه تکرار) محاسبه شد؛ سپس تفاوت اثر مهاری هر جدایه انتروکوکوس بر روی باکتری‌های شاخص، با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و تفاوت اثر جدایه‌ها بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی با آزمون تی مستقل (Independent-Sample T Test) در سطح احتمال ۵ درصد ارزیابی گردید. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

یافته‌ها

بر اساس یافته‌های مطالعه، تعداد ۱۵۷ جدایه انتروکوکوس در مرحله غربال‌گری مورد شناسایی قرار گرفتند که مشتمل بر ۹ گونه مختلف انتروکوکوس بودند. گونه‌های به‌دست آمده شامل، *انتروکوکوس فاسیوم*، *فکالیس*، *گالیناروم*، *اویوم*، *ماندتی*، *کازلیفلاووس*، *هایرا*، *ساکارولیتیکوس* و *رافینوسوس* بودند. در بین انواع نمونه‌های غذایی مورد آزمایش، شیر خام حاوی متنوع‌ترین گونه‌های انتروکوکوس بود؛ طوری که به‌جز *انتروکوکوس اویوم*، ۸ گونه دیگر این جنس از شیر خام جداسازی شدند. بعد از شیر خام، پنیرهای سنتی دارای تنوع بالایی از گونه‌های این باکتری بودند؛ در مقابل، کشک کم‌ترین میزان حضور انتروکوکوس (یک جدایه) را داشت (جدول ۱).

از بین ۱۵۷ جدایه انتروکوکوس، ٢٤ جدایه با در نظر گرفتن نوع نمونه و تنوع گونه‌ای انتروکوکوس انتخاب شدند. اثر مهاری جدایه‌های مزبور بر روی ۹ باکتری‌های شاخص در جدول (۱) نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، تمامی جدایه‌ها اثر مهاری بر باکتری‌های شاخص داشتند؛ با این توضیح که جدایه‌های مختلف دارای درجات متفاوتی از اثر مهاری بوده و هاله عدم رشد با قطر متفاوت ایجاد نمودند (شکل ۱). این تفاوت نه‌تنها در بین گونه‌های مختلف انتروکوکوس، بلکه بین جدایه‌های یک گونه معین، مشاهده شد.

جدول (۱)- تنوع گونه‌ای انتروکوکوس‌های جدا شده از نمونه‌های شیر خام و فرآورده‌های سنتی و میانگین (n=3) قطر هاله مهاری ایجاد شده توسط گونه‌های انتروکوکوس در پیرامون باکتری‌های شاخص

گونه انتروکوکوس	جدایه	نمونه غذایی	قطر هاله مهاری (میلی‌متر)*							
			L.i	*L.m*	*St.a*	*B.cer*	*E.c*	*Y.e*	*Sal.t*	*K.p*	*P.a*
فاسیوم	۱	شیر خام	٤/٦^{aAB}	٥^{aA}	٦^{aA}	٥^{aA}	١٠^{bAB}	١٣^{cE}	١٠/٣^{cBC}	٤/٦^{aA}	١٨/٦^{dD}
	۲	ماست	٥^{aAB}	٧/٣^{bAB}	١٥/٣^{deDE}	١٤/٣^{dD}	١٦/٦^{eD}	١٠/٦^{cD}	٢٠/٦^{fE}	٥/٦^{aAB}	١٠/٦^{cBC}
	۳	پنیر	٥/٣^{aAB}	١٩/٦^{dD}	١١^{bC}	١٤^{cD}	١٩/٦^{dE}	٩/١^{bCD}	١٩^{dE}	٥/٣^{aAB}	٦/٦^{aAB}
	٤	خامه	١١/٦^{bC}	١٠^{aC}	١٧^{dE}	١٠^{abBC}	١٥/٣^{cCD}	٨/٣^{aC}	١٩^{dE}	١٠/٣^{abC}	١٠^{abBC}
	٥	کره	٦^{aAB}	٩/٨^{cC}	١٤/٦^{dD}	١٣/٣^{dCD}	١٣/٣^{dC}	١١/٣^{cdDE}	١٩^{eE}	٦/٦^{abAB}	٨/٦^{bB}
	٦	کشک	١١^{bC}	١١/٦^{bC}	١١/٢^{bCD}	١٥/٤^{dD}	٢١^{eE}	٩/٣^{abCD}	١٦/٥^{dD}	١٣/٣^{cD}	٨/٦^{aB}
فکالیس	۷	شیر خام	٦^{aAB}	٦/٣^{aAB}	٦/٣^{aAB}	٦/٣^{aAB}	١١/٢^{bB}	١٠^{bCD}	١١/٦^{bBC}	٧/٦^{aBC}	١٨/٣^{cD}
	۸	پنیر	٦/٨^{aBC}	٥/٣^{aAB}	١٩^{fE}	١٠/٣^{dBC}	١١^{dB}	٧/٣^{abBC}	١٢/٣^{eC}	١٠/٤^{dC}	٩^{bB}
	۹	خامه	٧/٦^{bBC}	٥^{aA}	٧^{abAB}	٧^{abAB}	٩/٦^{bAB}	١٢^{cDE}	٩/٣^{bAB}	٧^{abB}	٩^{bB}
	۱۰	کره	١٠^{bC}	٤^{aA}	٩/٥^{bBC}	١٠^{bBC}	١٨/٣^{dDE}	١١/٣^{bcDE}	١٣/٣^{cCD}	١٠^{bC}	١٠/٣^{bBC}
	۱۱	دوغ	٤/٦^{aA}	١٠/٦^{bcC}	١٨/٣^{eE}	١٨^{eE}	١٥/٣^{dCD}	٩/٣^{bCD}	١١/٨^{cC}	٩/٣^{bC}	١٠/٦^{bcBC}
گالیناروم	۱۲	شیر خام	٦/٦^{aAB}	١٠^{bC}	١١/٤^{bcC}	٨/٣^{abB}	١١/٦^{bcBC}	١٦/٦^{dF}	١٠/٣^{bcBC}	٩/٦^{bC}	١٢/١^{cC}
	۱۳	پنیر	٤/٦^{aAB}	٦/٦^{abAB}	٨/٦^{bcB}	٦/٣^{abAB}	١٣/٥^{dC}	١٢^{dDE}	١٣/٣^{dCD}	٩/٣^{cC}	٩/١^{cB}
	١٤	خامه	٥/٣^{aAB}	٥/٦^{aAB}	٧/٦^{abAB}	٥/٣^{aA}	١٠^{bAB}	٦/١^{aB}	٩/٦^{bB}	٩/٣^{bC}	١٣/٣^{cC}
	١٥	کره	٤^{aA}	٧/٣^{bAB}	١٢^{cD}	١١/٣^{cC}	١٠/٣^{cAB}	٨/٦^{bcC}	٩/٢^{bcAB}	١٠/٦^{cC}	١١/٥^{cC}
آویوم	١٦	پنیر	٧/٦^{abBC}	٦^{aAB}	٧/٦^{abAB}	٦/٣^{aAB}	٨/٨^{bA}	١٣/٣^{dE}	٩/٣^{bAB}	٧/٥^{abBC}	٩/٦^{bBC}
	١٧	خامه	٤/٣^{aA}	٦/٢^{abB}	٦/٣^{abA}	٥^{aA}	٩/٦^{bAB}	٩/٦^{bCD}	٨/٩^{bAB}	٩/٦^{bC}	١٣/٣^{dC}
ماندتی	١٨	شیر خام	١٠^{cC}	٧/٦^{bAB}	١٩/٦^{fE}	١٤/٨^{eD}	١٣/٥^{deC}	٣^{aA}	١١/٧^{cdC}	٩/٦^{bcC}	٤/٦^{aA}
	١٩	دوغ	٦^{aAB}	٨/١^{bBC}	١١^{dcC}	٦/٣^{aAB}	١١^{dcB}	٧/٦^{abBC}	٩/٦^{bcB}	٦/٣^{aAB}	٩/٣^{bcB}
کازلیفلاووس	٢٠	شیر خام	٥/٦^{aAB}	٥/٦^{aAB}	٩/٣^{bcBC}	٥/٣^{aA}	١٠^{cAB}	١١/٦^{cD}	٨^{bcAB}	٧/٣^{abBC}	١١/٦^{cC}
	٢١	خامه	٤/٢^{aA}	٤/٦^{abA}	٦/٣^{bA}	٥^{abA}	٨/٦^{cA}	١٠/٦^{cD}	٧/٤^{bcA}	٦/٢^{bAB}	٩/٨^{cBC}
هایرا	٢٢	شیر خام	٥^{aAB}	٥/٣^{aAB}	٨/٦^{bB}	٥/٦^{aA}	١٠/١^{bAB}	١٤^{cE}	٩^{bAB}	٦/٩^{aB}	١٠^{bBC}
ساکارولیتیکوس	٢٣	شیر خام	٩/٨^{bcC}	٧^{abAB}	١١/٦^{cD}	٨/٦^{bBC}	١١/٣^{cBC}	٥/٦^{aB}	١٤/٦^{dD}	٨/٣^{bBC}	٥/٨^{aA}
رافینوسوس	٢٤	شیر خام	٥/٣^{aAB}	٧^{abAB}	٨/٣^{bB}	٦/٨^{aAB}	١٢/٦^{cBC}	١٣/٩^{Ec}	١٠^{bBC}	٦/٦^{aAB}	١٠/٣^{BCb}

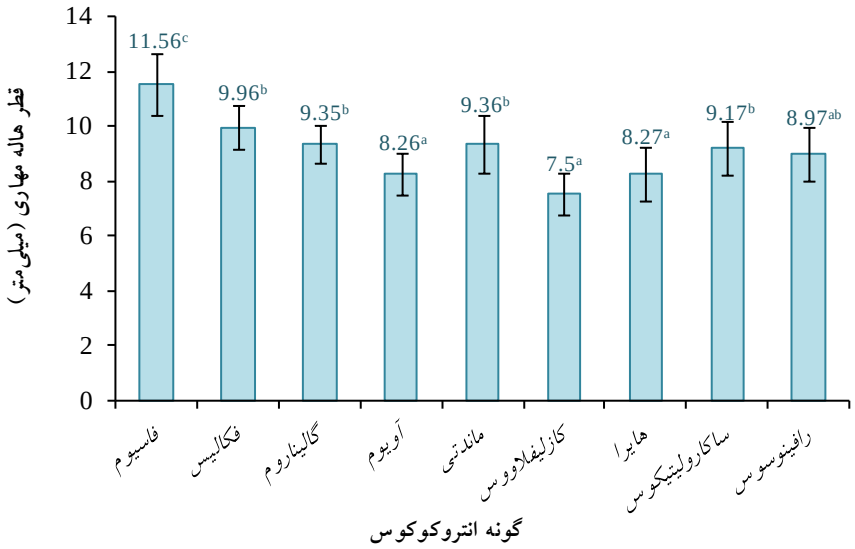
* *L.i*: *Listeria ivanovii*, *L.m*: *Listeria monocytogenes*, *St.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.cer*: *Bacillus cereus*, *E.c*: *Escherichia coli*, *Y.e*: *Yersinia enterocolitica*, *Sal.t*: *Salmonella* Typhimurium, *K.p*: *Klebsiella pneumonia*, *P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*.

$^{a, b, c, d, e, f}$ حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده معنادار (P<۰/۰۵). بودن تفاوت بین میانگین‌ها می‌باشد.

$^{A, B, C, D, E, F}$ حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده معنادار (P<۰/۰۵). بودن تفاوت بین میانگین‌ها می‌باشد.

شکل (۱)- قطر هاله عدم رشد باکتری‌های شاخص در پیرامون پرگنه‌های انتروکوکوس

میانگین قطر هاله مهاری ایجاد شده توسط گونه‌های انتروکوکوس نشان داد، *انتروکوکوس فاسیوم* دارای بیش‌ترین اثر ضدباکتریایی بود و پس از آن به‌ترتیب گونه‌های *فکالیس*، *ماندتی*، *گالیناروم*، *ساکارولیتیکوس*، *رافینوسوس*، *هایرا* و *آویوم* قرار داشتند (نمودار ۱).



نمودار (۱)- میانگین قطر هاله مهاری گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های شاخص

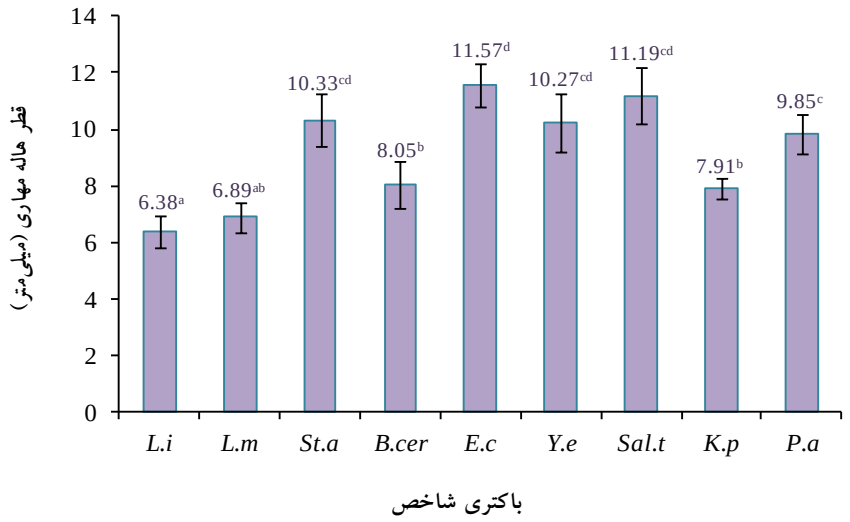
مقایسه اثر مهاری گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در مطالعه حاضر نشان داد، در مجموع گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های گرم منفی اثر مهاری بیشتری داشتند؛ به این معنی که از مجموع ۹ گونه انتروکوکوس، ۷ گونه به‌طور معناداری ($P<۰/۰۵$). بر روی باکتری‌های گرم منفی مؤثرتر بودند. اما این تفاوت در مورد گونه *ساکارولیتیکوس* معنادار نبود و صرفاً گونه *ماندتی* اثر ضدباکتریایی بیشتری بر گرم مثبت‌ها داشت (جدول ۲).

جدول (۲)- میانگین قطر هاله مهاری گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های شاخص گرم مثبت و منفی

گونه انتروکوکوس	قطر هاله مهاری (میلی‌متر)	
	گرم مثبت	گرم منفی
فاسیوم	۱۰/۵۷[a]	۱۲/۳٤[b]
فکالیس	۸/٦٦[a]	۱۱[b]
گالیناروم	۷/٥٤[a]	۱۰/۷۹[b]
آویوم	٦/۱٦[a]	۹/۹٥[b]
ماندتی	۱۰/۳[b]	۸/٦۲[a]
کازلیفلاووس	٥/۷۳[a]	۸/۹۱[b]
هایرا	٦/۱[a]	۱۰[b]
ساکارولیتیکوس	۹/۲٥[a]	۹/۱۲[a]
رافینوسوس	٦/۸٥[a]	۱۰/٦۸[b]

[a, b]: حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده معنادار (P<۰/۰٥) بودن تفاوت بین گروه‌ها می‌باشد.

در نمودار (۲) میانگین قطر هاله مهاری ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف انتروکوکوس بر هر یک از باکتری‌های شاخص نشان داده شده است. در این نمودار صرف‌نظر از گونه و سویه انتروکوک‌ها، اثر مهاری آن‌ها بر باکتری‌های غذایی برآورد شده است تا در حالت کلی میزان حساسیت و مقاومت هر باکتری نسبت به انتروکوکوس‌ها سنجیده شود. بر اساس نتایج حاصله، *اشریشیا کولای* (با هاله مهاری ۱۱/۵۷ میلی‌متر) حساس‌ترین و *لیستریا ایوانووی* (با هاله مهاری ٦/۳۸ میلی‌متر) مقاوم‌ترین باکتری‌های شاخص در مقابل خاصیت آنتاگونیستی انتروکوکوس‌ها بودند.



نمودار (۲)- میانگین قطر هاله مهاری گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های شاخص

L.i: *Listeria ivanovii*, *L.m*: *Listeria monocytogenes*, *St.a*: *Staphylococcus aureus*, *B.cer*: *Bacillus cereus*, *E.c*: *Escherichia coli*, *Y.e*: *Yersinia enterocolitica*, *Sal.t*: *Salmonella* Typhimurium, *K.p*: *Klebsiella pneumonia*, *P.a*: *Pseudomonas aeruginosa*.

نتایج PCR نشان داد، از مجموع ۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس*، ۲ مورد (سویه‌های جدا شده از کره و شیرخام) حاوی ژن حدت *Esp* بودند. در مورد جدایه‌های انتروکوکوس *فاسیوم*، ژن حدت *Asa1* در هیچ یک از ٦ جدایه ردیابی نشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تعداد ۱۵۷ جدایه انتروکوکوس با ۹ گونه مختلف از نمونه‌ها جداسازی شد که حاکی از حضور و تنوع بالای انتروکوکوس‌ها در شیر خام و فرآورده‌های سنتی منطقه تبریز می‌باشد. انتروکوکوس‌ها به‌عنوان بخشی از جمعیت میکروبی روده دام‌ها، به‌طور معمول به شیر خام و به‌دنبال آن به محصولات شیر راه پیدا می‌کنند. عواملی نظیر شیردوشی دستی و تحت شرایط غیربهداشتی، احتمال راه‌یابی انتروکوکوس‌ها به شیر خام را افزایش می‌دهد. به‌علاوه، تهیه فرآورده‌های سنتی شیر در کارگاه‌های غیراستاندارد موجبات ورود میکروب‌ها از آب، سطوح و وسایل آلوده را فراهم می‌آورد. رشد در دامنه وسیع دمایی، تحمل غلظت بالای نمک و محیط‌های اسیدی و قلیایی از عوامل دیگری هستند که بقای انتروکوکوس‌ها را افزایش می‌دهد (Serio *et al*., 2010). انتروکوکوس‌ها طی دوره رسیدن برخی از فرآورده‌های شیر از جمله بسیاری از انواع پنیرهای سنتی، نقش مهمی در تکوین خصوصیات ارگانولپتیکی ایفا می‌کنند (Giraffa, 2003)؛ از طرفی، انتروکوکوس‌ها با تولید متابولیت‌هایی اثر آنتاگونیستی بر طیف وسیعی از باکتری‌ها دارند (Rasouli Pirouzian *et al*., 2009).

بر اساس یافته‌های به‌دست آمده، تمامی ٢٤ جدایه انتخاب شده انتروکوکوس، هرچند با درجات مختلف، دارای اثر مهاری بر باکتری‌های شاخص بودند؛ در همین راستا تحقیقات مشابهی انجام یافته است که نشان می‌دهد انتروکوکوس‌های جدا شده از فرآورده‌های سنتی شیر دارای خاصیت ضدمیکروبی علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی هستند (Rashid *et al*., 2015; Carasi *et al*., 2014; Lei *et al*., 2015)؛ اما آن‌چه که نتایج مطالعه حاضر را از مطالعات مشابه متمایز می‌سازد، میزان اثر مهاری ایجاد شده توسط گونه‌های انتروکوکوس می‌باشد. به این معنی که در مطالعات مشابه، جدایه‌های انتروکوکوس روی برخی از باکتری‌های شاخص، آن‌هم به‌شکل جزئی، اثر مهاری داشتند؛ در حالی‌که در تحقیق حاضر، تمامی ٢٤ جدایه مورد آزمایش روی ۹ باکتری شاخص (متشکل از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی) اثر مهاری داشتند. به‌علاوه، میزان هاله ایجاد شده در موارد متعددی بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر برآورد شد که بسیار بیشتر از تحقیقات مشابه بود. این حالت می‌تواند در نتیجه تفاوت در سویه‌های انتروکوکوس جداسازی شده از مناطق مختلف جغرافیایی و هم‌چنین باکتری‌های شاخص مورد مطالعه باشد. اما آن‌چه مسلم است، روش و تکنیک ارزیابی اثرات ضدمیکروبی می‌تواند از عوامل مهم و موثر در کسب نتایج متفاوت در این قبیل آزمون‌ها باشد. به‌طور مثال، در مطالعه‌ای اثرات ضدمیکروبی *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* با روش انتشار دیسکی (Disk diffusion) علیه *لیستریا مونوسایتوجنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* مشخص گردید که همه گونه‌ها دارای اثرات

ضدلیستریایی بودند اما تأثیری بر *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نداشتند (Lei *et al*., 2015)؛ در حالی‌که در تحقیق حاضر گونه‌های مشابه که با روش دولایه مورد ارزیابی قرار گرفته بودند، بر *لیستریا مونوسایتوجنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* موثر بوده و هاله عدم رشد قابل‌ملاحظه‌ای ایجاد نمودند (جدول ۱). در همین راستا و طی مطالعه‌ای، از روش‌های مختلفی جهت بررسی خاصیت ضدمیکروبی سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس دامنوسوس* (*Lactobacillus damnosus*) علیه باکتری‌های غذایی استفاده شد. یافته‌ها نشان داد روش دولایه در مقایسه با روش‌های انتشار دیسکی و چاهک (Well diffusion) نتایج بهتری در پی داشته است (Polak-Berecka *et al*., 2009).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد گونه‌های مختلف انتروکوکوس و هم‌چنین جدایه‌های متنوع یک گونه، اثر مهاری متفاوتی بر باکتری‌های شاخص داشتند؛ طوری‌که قطر هاله مهاری ایجاد شده از ۳ میلی‌متر در *انتروکوکوس ماندتی* تا ۲۱ میلی‌متر در *انتروکوکوس فاسیوم* متغیر بود. این تفاوت نه‌تنها در بین گونه‌های متنوع انترکوکوس، بلکه در بین جدایه‌های یک گونه مشخص، مشاهده گردید (جدول ۱). اما به‌طور میانگین گونه *کازلیفلاووس* با میانگین هاله مهاری ۷/۵ میلی‌متر کم‌ترین اثر آنتاگونیستی و گونه‌های *فاسیوم* و *فکالیس* به‌ترتیب با میانگین هاله مهاری ۱۱/۵۶ و ۹/۹۶ میلی‌متر اثر ضدباکتریایی بیشتری در قیاس با سایر گونه‌های انتروکوکوس نشان دادند (نمودار ۱). در مطالعات مختلف کم و بیش نتایج مشابه تحقیق حاضر به‌دست آمده است. برای مثال، گونه‌های انتروکوکوس جداسازی شده از کفیر فعالیت ضدمیکروبی علیه *سالمونلا انتریکا*، *سودوموناس آیروجینوزا*، *شیگلا فلکسنری* (*Shigella flexneri*)، *اشریشیا کولای*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشتند (Caeasi *et al*., 2014). هم‌چنین گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* جداسازی شده از فرآورده‌های پروبیوتیکی شیر در بازار چین اثر بازدارنده علیه *لیستریا مونوسایتوجنز* نشان دادند (Lei *et al*., 2015). نکته قابل‌توجه در نتایج تحقیق حاضر، تفاوت در میزان بازدارندگی گونه‌های انتروکوکوس بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بود و به‌طور میانگین، اغلب گونه‌های انتروکوکوس (به‌جز دو مورد) دارای خاصیت آنتاگونیستی بیشتری (P<۰/۰۵)). بر باکتری‌های گرم منفی بودند (جدول ۲). این موضوع بر خلاف یافته‌های مطالعاتی است که اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیکی نظیر لاکتوباسیلوس‌ها و لاکتوکوکوس‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند (Alvarado *et al*., 2006; Aguilar *et al*., 2011; Uraipan and Hongpattarakere, 2015). به‌نظر می‌رسد تفاوت در یافته‌های حاصله در نتیجه تنوع عوامل آنتاگونیستی‌ای (کاهش pH، تولید H_2O_2، تولید باکتریوسین‌ها و نظایر آن) باشد که توسط انتروکوکوس‌ها و سایر باکتری‌های لاکتیکی تولید می‌شوند (Alvarado *et al*., 2006).

در اغلب تحقیقات انجام یافته، خاصیت آنتاگونیستی گونه‌های انتروکوکوس *فکالیس* و *فاسیوم* ارزیابی شده است (Carasi *et al*., 2014; Lei *et al*., 2015)؛ این در حالی است که بیش‌ترین فراوانی (۹۴/۱ درصد) ژن‌های عامل حدت در بین جدایه‌های بالینی همین دو گونه از انتروکوکوس گزارش گردیده است (Ferguson *et al*.,

2016; Heidari *et al*., 2017). این موضوع محدودیت بزرگی در ارتباط با استفاده از انتروکوکوس‌ها و خواص آنتاگونیستی آن‌ها به‌عنوان باکتری‌های ایمن علیه میکروب‌های بیماری‌زا در مدل‌های غذایی می‌باشد. نتایج PCR در مطالعه حاضر نشان داد، از ۵ جدایه *انتروکوکوس فکالیس*، ۲ جدایه (٤٠ درصد) حاوی ژن حدت *Esp* بودند و در جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* ژن حدت *Asa1* در هیچ یک از ٦ جدایه ردیابی نشد. در همین راستا، ژن حدت در گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از محصول تخمیری سویا ردیابی نشد (Yoon *et al*., 2008) و در مجموع گونه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* در مقایسه با گونه‌های *انتروکوکوس فکالیس* دارای پتانسیل بیماری‌زایی کمتری تشخیص داده شدند (Dogru *et al*., 2010). ممکن است تفاوت در میزان فراوانی عوامل حدت مربوط به تفاوت در منبع جدایه‌های انتروکوکی باشد؛ به این معنی که در جدایه‌های بالینی میزان فراوانی ژن‌های حدت در قیاس با جدایه‌های غذایی و محیطی بالاتر باشد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان به این جمع‌بندی رسید، شیر خام و فرآورده‌های سنتی تولید شده در منطقه تبریز منبع غنی از گونه‌های انتروکوکوس می‌باشند. انتروکوکوس دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه باکتری‌های شاخص غذایی بودند و میزان اثر مهاری در بین گونه‌های مختلف و سویه‌های یک گونه واحد، متفاوت برآورد شد. با توجه به این‌که تنها ٢٤ جدایه انتروکوکوس انتخاب و مورد آزمون‌های تکمیلی قرار گرفته بودند، به‌نظر می‌رسد در صورت آزمایش تمامی ۱۵۷ جدایه، می‌توانست منجر به حصول نتایج متفاوتی گردد. به‌علاوه، تمامی جدایه‌های انتروکوکوس توانستند بر روی ۹ باکتری شاخص غذایی اثر مهاری ایجاد کنند که در بین آن‌ها باکتری‌های مهم و مقاوم به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها وجود داشت. هم‌چنین بیشترین خاصیت مهاری ایجاد شده در جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* مشاهده شد. با وجود این‌که ٦٠ درصد گونه‌های *فکالیس* و ۱۰۰ درصد گونه‌های *فاسیوم* جدا شده در مطالعه حاضر فاقد ژن‌های حدت *Esp* و *Asa1* بودند؛ اما لازم است برای حصول اطمینان از سلامت مصرف‌کننده، قبل از به‌کارگیری در مدل‌های غذایی، ژن‌های حدت دیگری در این گونه‌های انتروکوکوس مورد بررسی قرار گیرند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Aguilar, C., Vanergas, C. and Klotz, B. (2011). Antagonistic effect of Lactobacillus strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. Journal of Dairy Research, 78(2): 136–143.
- Alvarado, García Almendárez, B.E. , Martin, S.E. and Regalado, C. (2006). Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. Revists Latinoamericano De Microbiologia, 48(3–4): 260–268.

•Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L. and Palop, L. (2011). Enterococcus populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity and safety aspects. Food Microbiology, 28: 891–899.
•Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2): 71–79.
•Carasi, P., Jacquot, C., Romanin, D.E., Elie, A.M., De Antoni, G.L., Urdaci, M.C. et al. (2014). Safety and potential beneficial properties of Enterococcus strains isolated from kefir. International Dairy Journal, 39(1): 193–200.
•Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology, 71(1): 1–20.
•Dever, L.L. and Handwerger, S. (1996). Persistence of Vancomycin-resistance *Enterococcus faecium* gastrointestinal tract colonization antibiotic-treated mice. Microbe Drug Resistant, 2: 415–421.
•Ferguson, D.M., Talavera, G.N., Hernández, L.A.R., Weisberg, S.B., Ambrose, R.F. and Jay, J.A. (2016). Virulence Genes among *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from coastal beaches and human and nonhuman sources in southern California and Puerto Rico. Journal of Pathogens, 3437214.
•Fisher, K. and Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. Microbiology, 155, 1749–1757.
•Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y., Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel Enterococcus species of dairy origin, *E. italicus*. International Journal of Food Microbiology, 123: 204–211.
•Fracalanzza, S.A.P., Scheidegger, E.M.D., Santos, P.F.D., Leite, P.C. and Teixeira, L.M. (2007). Antimicrobial resistance profiles of Enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. Mem Inst Oswaldo Crus, Rio de Janeiro, 102(7): 853–859.
•Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H and Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology, 83: 105–122.
•Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88: 215–222.
•Gomes, B.C., Esteres, C.T., Palozzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., Sechi, L.A. et al. (2008). Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. Journal of Food Microbiology, 25: 668–675.
•Granato, D., Branco, G.F., Gomes Cruz, A., Faria, J.A.F., Shah, N.P. (2005). Probiotic dairy products as functional foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9(5): 455–470.
•Jamet, E., Akary, E., Poission, M.A. Cham, J.F., Bertrand, X. and Serror, P. (2012). Prevalence and characterization of antibiotic-resistant *Enterococcus feacalis* in French cheese. Food Microbiology, 31, 191–198.
•Heidari, H., Hasanpour, S., Ebrahim-Saraie, H.S. and Motamedifar, M. (2017). High incidence of virulence factors among clinical *Enterococcus faecalis* isolates in southwestern Iran. Infection & Chemotherapy, 49(1): 51–56.
•Hockett K.L. and Baltrus, D.A. (2017). Use of the soft-agar overlay technique to screen for bacterially produced inhibitory compounds. Journal of Visualized Experiments, (119): 55064.
•Lei, M., Dai, X. and Liu, M. (2015). Biological characteristics and safety examination of five Enterococcal strains from probiotic products. Journal of Food Safety, 35(3): 324–335.
•Manero, A. and Blanch, A.R. (1999). Identification of Enterococcus spp. with a biochemical key. Applied and Environmental Microbiology, 65(10): 4425–4430.
•Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupre, I. et al. (2013). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. International Journal of Food Microbiology, 88: 291–304.

- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A. and Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. International Dairy Journal 16: 867–875.
- Moreno, M.R.F., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E and De Vuyst, L. (2006). The role and application of *Enterococci* in food and health. International Journal of Food Microbiology, 106(1): 1–24.
- Nam, H.M., Kim, J.M., Moon, J.S., Kang, H.M., Jang, K.C., Joo, Y.S. et al. (2009). Antimicrobial resistance of *Enterococci* isolated from mastitis bovine milk samples in Korea. Zoonoses and Public Health, National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang City, Gyeonggi-d Korea, 48, 430–436.
- Polak-Berecka, M., Waśko, A. and Koston, D. (2009). Comparison of different methods for detection of antimicrobial activity of probiotic strains of *Lactobacillus rhamnosus* against some food spoilage microorganisms. Annales UMCS, Biologia, 64: 15–24.
- Rashid, S. Hasan Shahiyan, M., Saeedi Asl, M.R. and Estiri, H. (2015). Screening, identification and evaluation of probiotic potential of Enterococci in traditional dairy products of Sabzevar. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 21 (1): 7–16.
- Rasouli Pirouzian, H., Hesari, J., Farajnia, S., Moghaddam, M. and Ghiassifar, Sh. (2009). Isolation and identification of dominant strains of enterococci in traditional lighvan cheese. Journal of Food Research, 19(1): 13–24. [In Persian]
- Sánchez Valenzuela, A., ben Omar, N., Abriouel, H., Lucas Lopez, R., Veljovic, K., Martinez Canamero, M. et al. (2009). Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. Food Control, 20, 381–385.
- Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A. and Suzzi, G. (2010). Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. International Dairy Journal 20: 459–464.
- Uraipan, S. and Hongpattarakere, T. (2015). Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy Thai infants. Jundishapur Journal of Microbiology, 8(6): 18264.
- Vankerckhoven, V., Van Autgaerden, T, Vael, C., Lammens, C., Chapelle, S., Rossi, R. et al. (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.
- Yoon, M.Y., Kim, Y.J. and Hwang, H.J. (2008). Properties and safety aspects of *Enterococcus faecium* strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. LWT-Food Science and Technology, 41(5): 925–933.

Inhibitory effect of native enterococci isolates on some of the foodborne bacterial pathogens

Tafkiki, S.[1], Hanifian, S.[2*]

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor of Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

[*]Corresponding author's email: hanifian@iaut.ac.ir

(Received: 2018/4/10 Accepted: 2018/5/5)

Abstract

Enterococci are among lactic acid bacteria that are homogeneous and are commonly found in raw milk and its products. The purpose of this study was to isolate Enterococcus species from raw milk and traditional milk products in Tabriz region and to study their inhibitory effect on some of pathogenic bacteria. For this, 105 specimens including 15 samples of each of raw milk, yogurt, cheese, cream, butter, dough, and whey were tested. After isolation and differential identification of the species, 24 isolates were selected based on the sample type and the variety of Enterococcus species. Due to the pathogenic potential of *E. faecalis* and *E. fascism* species, they were evaluated for the presence of *Esp* and *Asa1* genes, respectively. The inhibitory effect of Enterococcus isolates was tested on nine important foodborne pathogens using overlay method. According to the results, nine species of *E. fascism*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. avium*, *E. Benedetti*, *E. caseliflavus*, *E. hirae*, *E. saccharoliticus* and *E. raffinosus* were isolated. All isolates had an inhibitory effect on indicator organisms; however, the inhibitory effect was found different among various species and various strains. *E. faecalis* and *E. fascism* species had the most antibacterial effects. The molecular evaluation showed that out of 5 isolates of *E. faecalis*, 2 isolates contained *Esp* gene. In the case of *E. faecalis*, none of the isolates harbored *Asa1* gene. If further experiments are carried out in relation to the proven safety of enterococci, their inhibitory effect on food pathogenic bacteria can be used.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Enterococcus, Raw milk, Traditional products, Antagonistic effect, Dual layer method