

Evaluation of Safety Aspects and Antagonistic Activity of *Enterococcus* Strains Isolated from Traditional Pot Cheese

Sami A.H¹, Khandaghi J², Abbasgholizadeh N^{*3}

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

2. Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran.

3. Department of Public health, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran.

* **Corresponding author.** Tel: +984533513775, Fax: +984533512004, E-mail: nabasgholizadeh@yahoo.com

Received: Apr 19, 2021 Accepted: Sep 23, 2021

ABSTRACT

Background & objectives: Safety control of traditional raw milk cheese such as Pot cheese is of special importance. Although enterococci can play beneficial probiotic or technological properties in cheese and their use in food is the subject of debate due to evidence of pathogenicity and antibiotic resistance.

Method: In the present study, after isolation and morphological and biochemical identification of enterococci isolated from 50 samples of traditional Pot cheeses in West Azerbaijan province, the antibacterial properties of the isolates were determined by well diffusion method and the resistance pattern to 12 common clinical antibiotics was evaluated using disk diffusion method. The hemolytic properties of the isolates were also investigated.

Results: The results showed the presence of enterococci in 74% of the Pot cheese samples. Among the identified species, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* had the highest frequency with 44.7% and 37.2%, respectively. The highest inhibitory effects of isolates were recorded for *Listeria monocytogenes* (83.7%). Studies showed that over 80% of isolates were sensitive to eight common clinical antibiotics, including vancomycin. Also, all enterococcus isolates lacked hemolysis activity.

Conclusions: This study showed that traditional jar cheese is a rich source of *Enterococcus* bacteria with antimicrobial activity and high sensitive to common antibiotics such as vancomycin. If more safety aspects are studied and other probiotic properties are evaluated, these isolates can be used as a source of native probiotic bacteria in other fermented products.

Keywords: *Enterococcus*, Pot cheese, Antagonistic Activity, Antibiotic Resistance.

Conflict of interest: None declared.

ارزیابی جنبه‌های ایمنی و فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های انتروکوکوس جداسازی شده از پنیرهای سنتی کوزه

امیرحسین سامی^۱، جلیل خندقی^۲، ناطق عباسقلی‌زاده^{۳*}

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۳. گروه بهداشت عمومی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵۳۳۵۱۳۷۷۵، فکس: ۰۴۵۳۳۵۱۲۰۰۴، ایمیل: nabbasgholizadeh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: کنترل ایمنی انواع پنیرهای سنتی تهیه شده از شیر خام مانند پنیر کوزه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. گرچه باکتری‌های انتروکوکوس می‌توانند خواص مفید پروبیوتیکی با تکنولوژیکی در پنیر ایفا کنند ولی بکارگیری آن‌ها در غذاها بدلیل شواهد مبتنی بر بیماری‌زایی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آن‌ها مورد بحث و تردید بوده است.

روش کار: در تحقیق حاضر پس از جداسازی و شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری‌های انتروکوکوس جداسازی شده از تعداد ۵۰ نمونه پنیر کوزه‌ای سنتی در استان آذربایجان غربی، خواص ضد باکتریایی جدایه‌ها به روش انتشار چاهک تعیین و الگوی مقاومت به ۱۲ آنتی‌بیوتیک رایج بالینی با استفاده از روش انتشار دیسک ارزیابی شد. همچنین ویژگی همولیز کنندگی جدایه‌ها بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج وجود انتروکوکوس‌ها در ۷۴ درصد از نمونه‌های پنیر کوزه را نشان دادند. در بین گونه‌های شناسایی شده *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* به ترتیب با ۴۴/۷ و ۳۷/۲ درصد، بیشترین فراوانی را داشتند. بالاترین اثرات بازدارندگی جدایه‌ها در مورد باکتری *لیستریا مونوسیتوجنز* (۸۳/۷٪) ثبت شد. بررسی‌ها نشان داد بالای ۸۰ درصد از جدایه‌ها به ۸ آنتی‌بیوتیک رایج کلینیکی از جمله ونکوماپسین حساس بودند. همچنین همه باکتری‌های انتروکوکوس جداسازی شده فاقد قدرت همولیز بودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که پنیر سنتی کوزه منبع غنی از باکتری انتروکوکوس دارای فعالیت ضد میکروبی و حساسیت بالا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج از جمله ونکوماپسین است. در صورت مطالعه جنبه‌های بیشتر ایمنی و همچنین ارزیابی دیگر خواص پروبیوتیکی، می‌توان از این جدایه‌ها به‌عنوان منبع باکتری‌های پروبیوتیک بومی در دیگر محصولات تخمیری نیز استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: انتروکوکوس، پنیر کوزه، خواص آنتاگونیستی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

دریافت: ۱۴۰۰/۱/۳۰ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱

مقدمه

پنیر به‌عنوان جزئی از گروه لبنیات، منبع خوبی برای پروتئین، کلسیم و فسفر محسوب می‌شود (۱). تعداد زیادی از محصولات لبنی بومی برای قرون متمادی در

آذربایجان تولید شده و روش‌های سنتی جهت آماده‌سازی این محصولات هنوز هم وجود دارد و حتی بیشتر هم توسعه یافته است. یکی از این محصولات پنیر کوزه است که در شمال غرب

کشورمان و بخصوص استان آذربایجان غربی بیشتر تولید می‌شود. پنیر کوزه‌ای جزو پنیرهای زمینی^۱ است که بیشترین میزان تولید این نوع پنیر در یونان، ترکیه و در ایران (با نام‌های پنیر کوزه‌ای یا کویه پنیری) می‌باشد. این نوع پنیر از شیر خام گوسفند و بز و بدون افزودن استارتر، معمولاً در کوزه‌های سفالی یا دبه پلاستیکی تهیه و دوره رسیدن آن در شرایط غیرهوایی می‌باشد و در زیر خاک نگهداری می‌شود (۲). محصولات لبنی تخمیری سنتی همواره یکی از منابع مهم برای جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک بوده‌اند (۳).

کنترل ایمنی انواع پنیرهای سنتی تهیه شده از شیر خام مانند پنیر کوزه نیاز به توجه ویژه دارد. به دلیل فقدان عملیات حرارتی در این نوع پنیرها، آن‌ها معمولاً با باکتری‌های انتروکوک^۲ آلوده می‌شوند (۴) که دارای خواص مفید و بعضاً مضری است. انتروکوک‌ها از باکتری‌های گروه لاکتیک اسید^۳ بوده و کوکسی‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیراسپورزا و هموفرماتتایو با احتیاجات غذایی پیچیده هستند که پراکندگی گسترده در طبیعت دارند. آن‌ها همچنین قسمتی از فلور میکروبی طبیعی روده پستانداران و انسان را تشکیل می‌دهند (۵،۶). جنس انتروکوکوس بیش از ۲۰ گونه دارد ولی *انتروکوکوس فکالیس*^۴، *انتروکوکوس فاسیوم*^۵ و *انتروکوکوس دورانس*^۶ بیشترین فراوانی را در بین سایر گونه‌ها به خود اختصاص داده است (۷). بر اساس تحقیقات و مطالعات انجام شده، وجود گونه‌های مختلف انتروکوکوس در شیر و فراورده‌های آن به اثبات رسیده است (۸-۱۰). اخیراً به انتروکوکوس‌ها برای استفاده به عنوان پروبیوتیک در محصولات لبنی توجه خاصی شده است.

تولید باکتریوسین و متابولیت‌های ضد میکروبی دیگر از جمله اسیدهای آلی و پراکسید هیدروژن توسط انتروکوکوس‌ها (۱۱) که از جمله باکتری‌های غالب در پنیر می‌باشند، مانع رشد پاتوژن‌های با منشأ مواد غذایی می‌شود. اما علی‌رغم داشتن تمامی این ویژگی‌ها انتروکوکوس‌ها به عنوان GRAS^۷ شناخته نمی‌شوند و بکارگیری انتروکوک‌ها در غذاها بدلیل شواهد مبتنی بر بیماری‌زایی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آن‌ها همیشه مورد بحث و تردید بوده است. در واقع انتروکوکوس‌ها به عنوان پاتوژن‌های فرصت طلبی شناخته می‌شوند که در ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های شایع در انسان نقش دارند. از طرف دیگر گزارشات زیادی مبنی بر بروز مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در انتروکوکوس‌های بیماری‌زا و محدود شدن روش‌های درمانی موثر بر عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری ذکر شده است (۱۲،۱۳).

خواص دوگانه باکتری‌های انتروکوک به‌عنوان میکروارگانیزم‌های مفید و یا پاتوژن‌های فرصت‌طلب، محققان را بر آن داشته تا به بررسی دقیق انتروکوکوس‌های جدا شده از مواد غذایی پرداخته و تاثیر آن‌ها بر سلامت مصرف‌کننده و از طرف دیگر امکان استفاده به عنوان آغازگر یا پروبیوتیک در محصولات لبنی را مورد بررسی قرار دهند. در مطالعه حاضر به ارزیابی خواص ضد میکروبی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی و ویژگی همولیزکنندگی باکتری‌های انتروکوک جداسازی‌شده از پنیرهای کوزه عرضه‌شده در استان آذربایجان غربی پرداخته شده است. پنیرهای کوزه‌ای سال‌ها است که در بین افراد بومی این مناطق مصرف می‌شود و تاکنون گزارشی از اثرات زیان‌بار آن بر سلامتی افراد ارائه نشده است. عدم وجود سابقه بررسی‌های مشابه بر لزوم انجام این مطالعه تاکید دارد.

⁷ Generally Recognized as Safe

¹ Earth Ware

² Enterococci

³ Lactic Acid Bacteria

⁴ *Enterococcus faecalis*

⁵ *Enterococcus faecium*

⁶ *Enterococcus durans*

روش کار

نمونه برداری

در این مطالعه تعداد ۵۰ نمونه پنیر کوزه‌ای تهیه شده به روش سنتی در زمستان سال ۱۳۹۹ به صورت تصادفی از محل‌های عرضه در شهرهای مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی و شناسایی انتروکوک‌ها

برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های انتروکوک از خصوصیات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی استفاده شد. برای این منظور ۵ گرم از هر نمونه پنیر به داخل ارلن حاوی ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین ریخته شده و هم زده شد تا به حالت یکنواخت درآید. از نمونه‌ها بعد از تهیه رقت‌های سریال ده برابر بر روی محیط کشت جامد کانامایسین آسکولین آگار^۱ کشت سطحی انجام و در دمای ۳۶ درجه سلسیوس ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد (۱۱). پرگنه‌های مشکوک به انتروکوک در این محیط کشت، گرد و به‌رنگ سفید تا خاکستری روشن با هاله سیاهی در اطراف آن‌ها هستند. آزمایشات تاییدی شامل رنگ‌آمیزی گرم و مشاهده کوکسی‌های زنجیره‌ای گرم مثبت، تست کاتالاز و رشد در حضور ۶/۵ درصد نمک و همچنین قدرت هیدرولیز اسکولین با رشد در محیط اسکولین بایل آگار^۲ نیز به کار گرفته شد (۱۴).

برای شناسایی گونه‌های انتروکوکوس، از آزمون‌های رشد در دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، هیدرولیز آرژنین و هیپورات، تولید پیگمان زرد، احیای تترازولیوم^۳ ۰/۰۱ درصد و تلوریت^۴ ۰/۰۴ درصد، قدرت حرکت و تخمیر قندهای آرابینوز، لاکتوز، سوربیتول، مانیتول، گلوکز، سوربوز و متیل گلوکوپیرانوزید با افزودن هر کدام از قندها به مقدار

^۱ Kanamycine Aesculin Azide Agar

^۲ Bile-Esculin Agar

^۳ Tetrazolium

^۴ Tellurite

یک درصد در محیط پایه قندی فنل رد^۵ و انکوباسیون به مدت ۱۸-۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس استفاده شد (۱۵).

فعالیت آنتاگونیستی

برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی جدایه‌های انتروکوک از روش چاهک^۶ استفاده شد. برای این منظور از روش احمدووا و همکاران (۲۰۱۳) با کمی تغییرات استفاده شد. بطور خلاصه پس از تهیه عصاره^۷ از کشت تازه انتروکوک‌ها، ۵۰ میکرولیتر از آن در چاهک‌های ایجادشده در محیط کشت MRS Soft Agar که حاوی ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون از کشت تازه هر کدام از باکتری‌های پاتوژن گرم منفی *اشریشیا کولای* (PTCC-1276) و *سالمونلا انتریکا* (PTCC-1709) و همچنین پاتوژن‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس ارتوس* (ATCC-25923)، *لیستریا مونوسایتوجنز* (PTCC-1163) و *سرسوس* (PTCC-1539) است، قرار داده و پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله عدم رشد اندازه گرفته شد. ایجاد هاله با قطر حداقل ۲ میلی‌متر به‌عنوان جواب مثبت تلقی می‌گردد (۱۶). عصاره‌های میکروبی قبل از استفاده به pH=۷ رسانده شده و به‌منظور جلوگیری از تخریب پروتئولیتیک باکتریوسین‌ها در آن، مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد حرارت دیدند. به‌منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت جدایه‌ها به ۱۲ آنتی‌بیوتیک رایج و پرکاربرد بالینی با استفاده از روش انتشار دیسک^۸ انجام شد. برای این منظور، ابتدا مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از کشت تازه هر یک از جدایه‌های انتروکوک که جذبی معادل نیم‌مک‌فارلند دارد، در حدود ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت Soft MRS Agar (حاوی ۱٪ آگار) اضافه و

^۵ Phynol Red Broth

^۶ Well Diffusion Agar

^۷ Cell Free Supernatant

^۸ Disk Diffusion Method

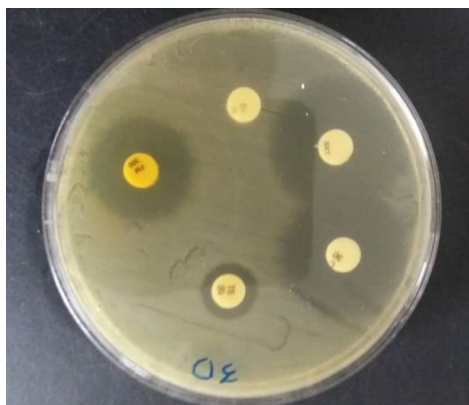
انتروکوکوس/ویوم (۳ جدایه) و انتروکوکوس هاپیره (۲ جدایه) بودند.

فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های انتروکوک

بالاترین خاصیت بازدارندگی جدایه‌ها بر روی پاتوژن‌های مورد مطالعه در مورد باکتری لیستریا مونوسایتوجنز ثبت شد به‌طوری‌که تنها ۱۴ مورد از جدایه‌های بررسی شده هیچ اثر ضدلیستریائی از خود نشان ندادند و هاله عدم رشد در دیگر جدایه‌ها مشاهده شد. همچنین اثرات ضد میکروبی علیه *اشریشیا کولای* و *باسیلوس سرئوس* به ترتیب در ۲۴ (۲۵/۵٪) و ۱۵ (۱۵/۹٪) مشاهده گردید. جدایه‌های انتروکوک هیچ اثر مہاری بر ضد دیگر پاتوژن‌های مورد مطالعه نشان ندادند.

حساسیت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها

الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های انتروکوک جداشده از پنیر کوزه‌ای در جدول ۲ نشان داده شده است. بالاترین میزان مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به ترتیب برای استرپتومایسین (۱۰۰٪) و سپس کوتریموکسازول (۶۴٪) بود. بالای ۸۰ درصد از جدایه‌های انتروکوک به ۸ آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه از جمله ونکومایسین، حساس بودند.



شکل ۱. قطر هاله عدم رشد در تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها

قدرت همولیز جدایه‌ها

در هیچ‌یک از جدایه‌های انتروکوک اثراتی به شکل ایجاد هاله شفاف همولیز (همولیز بتا) و یا تغییر رنگ

خوب مخلوط گردید. سپس آن را روی حدود ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MRS Agar که از قبل در پلیت استریل تهیه و سرد شده است، ریخته و دیسک‌های آنتی‌بیوتیک روی Soft Agar با فواصل مناسب قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه گرفته شد (۱۷).

قدرت همولیز

برای این منظور جدایه‌ها در محیط کشت پایه آگار خون‌دار حاوی ۵ درصد خون تازه گوسفند کشت و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. در پایان، شکل‌گیری هاله همولیز و یا تغییر رنگ سبز رنگ محیط کشت به ترتیب به‌عنوان همولیز بتا و آلفا در نظر گرفته شد (۱۸).

کلید آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام و نتایج بصورت میانگین \pm انحراف استاندارد گزارش شد. برای این آمار توصیفی از نرم‌افزار Excel-2010 استفاده شد.

یافته‌ها

انتروکوکوس‌های جداسازی شده

از مجموع ۵۰ نمونه پنیر کوزه بررسی شده، تعداد ۳۷ نمونه (۷۴٪) در محیط کشت KAA Agar حاوی پرگنه‌های تیپیک انتروکوک (پرگنه‌های گرد خاکستری تا سفید باهاله سیاه‌رنگ در اطراف آن) بوده و کشت ۱۳ نمونه (۲۶٪) فاقد باکتری انتروکوک تشخیص داده شد. انتخاب ۳ پرگنه از پلیت دارای رقت مناسب از هر نمونه و انجام آزمون‌های تکمیلی حضور جنس انتروکوکوس را در ۹۴ جدایه از ۱۱۱ پرگنه مشکوک (۸۴/۷٪) تأیید کرد. تست‌های افتراقی تشخیص جدایه‌ها در حد گونه نشان داد که *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* به ترتیب با ۴۲ (۴۴/۷٪) و ۳۵ (۳۷/۲٪) جدایه، بیشترین فراوانی را به خود اختصاص دادند. دیگر گونه‌های شناسایی شده شامل *انتروکوکوس دیورنس* (۴ جدایه)،

سبز (همولیز آلفا) در محیط کشت آگار خون‌دار مشاهده نشد و جدایه‌ها فاقد قدرت همولیز بودند.

جدول ۱. اثرات آنتاگونیستی باکتری‌های انتروکوک جداشده از پنیر کوزه‌ای

| گونه انتروکوکوس | جدایه | فعالیت ضد میکروبی (قطره‌اله عدم رشد به میلی‌متر) بر ضد | | | |
|--------------------|---------------------|--|------------------|---------------------|---------------------|
| | | اشریشیا کولای | سالمونلا انتریکا | استافیلوکوکوس ارتوس | لیستریا مونوسیتوجنز |
| فکالیس | میانگین ۴۲ جدایه | ۸/۲±۴/۱ | - | - | ۲۲/۲±۵/۲ |
| فاسیوم | میانگین ۳۵ جدایه | ۵/۳±۵/۸ | - | - | ۱۷/۹±۶/۳ |
| دیورنس | ۱ | - | - | - | - |
| | ۲ | ۹/۵ | - | - | ۲۱/۸ |
| | ۳ | - | - | - | - |
| | ۴ | - | - | - | ۲۰/۲ |
| اویوم | ۱ | ۱۷/۹ | - | - | ۲۱/۸ |
| | ۲ | - | - | - | ۱۶/۱ |
| | ۳ | ۸/۲ | - | - | ۱۷ |
| هایره | ۱ | - | - | - | ۱۲/۳ |
| | ۲ | - | - | - | - |

- بدون خاصیت آنتاگونیستی یا قطره‌اله عدم رشد کمتر از ۲ میلی‌متر

جدول ۲. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های انتروکوک جداشده از پنیر کوزه‌ای

| آنتی‌بیوتیک | قطره‌اله عدم رشد در باکتری‌های مقاوم (میلی‌متر) | تعداد (درصد) گونه‌های مقاوم انتروکوکوس | | | | |
|----------------|---|--|------------------|-----------------|----------------|----------------|
| | | فکالیس (n=۴۲) | فاسیوم (n=۳۵) | دیورنس (n=۴) | اویوم (n=۳) | هایره (n=۲) |
| ونکوماپسین | <۱۷ | (۱۶/۶)۷ | (۱۴/۳)۵ | (۲۵)۱ | (۰)۰ | (۵۰)۱ |
| سیپروفلوکساسین | <۱۳ | (۷/۱)۳ | (۵/۷)۲ | (۰)۰ | (۰)۰ | (۰)۰ |
| آمپی سیلین | <۲۵ | (۹/۵)۴ | (۱۴/۳)۵ | (۵۰)۲ | (۰)۰ | (۱۰۰)۲ |
| آزیترومایسین | <۱۲ | (۱۴/۳)۶ | (۱۴/۳)۵ | (۲۵)۱ | (۶۶/۶)۳ | (۵۰)۱ |
| اریترومایسین | <۱۸ | (۲۱/۴)۹ | (۱۷/۱)۶ | (۰)۰ | (۳۳/۳)۱ | (۰)۰ |
| پنی سیلین | <۲۳ | (۹/۵)۴ | (۱۷/۱)۶ | (۰)۰ | (۰)۰ | (۰)۰ |
| جنتامایسین | <۲۴ | (۳۰/۹)۱۳ | (۲۸/۶)۱۰ | (۵۰)۲ | (۰)۰ | (۱۰۰)۲ |
| تتراسایکلین | <۱۴ | (۴۲/۸)۱۸ | (۳۴/۳)۱۲ | (۲۵)۱ | (۱۰۰)۳ | (۱۰۰)۲ |
| کلرامفنیکل | <۱۷ | (۲۳/۸)۱۰ | (۱۴/۳)۵ | (۲۵)۱ | (۳۳/۳)۱ | (۰)۰ |
| کوتریموکسازول | <۱۰ | (۶۹)۲۹ | (۵۷/۱)۲۰ | (۱۰۰)۴ | (۱۰۰)۳ | (۵۰)۱ |
| استرپتومایسین | <۱۱ | (۱۰۰)۴۲ | (۱۰۰)۳۵ | (۱۰۰)۴ | (۱۰۰)۳ | (۱۰۰)۲ |
| نیتروفرانتوتین | <۱۴ | (۲۱/۴)۹ | (۱۷/۱)۶ | (۰)۰ | (۰)۰ | (۵۰)۱ |

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک ونکوماپسین از شرکت Biomark، دیسک‌های سیپروفلوکساسین، آزیترومایسین و اریترومایسین از شرکت ROSCO و بقیه دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت پادتن طب تهیه و استفاده شدند.

بحث

معرفی این محصولات در دیگر مناطق و یا حتی معرفی جهانی آن‌ها داشته باشد از طرفی تحقیقات نشان داده‌اند که تکنولوژی و روش‌های سنتی تهیه

مطالعه و شناسایی ویژگی‌های جمعیت میکروبی انواع محصولات تخمیری بومی می‌تواند نقش به‌سزایی در

محصولات تخمیری مختلف روی جمعیت میکروبی این مواد غذایی سنتی مؤثرند (۱۹،۲۰).

این باکتری‌های لاکتیک (LAB) اغلب به دلیل تحمل نمک، گرما، اسید و دما به عنوان بخشی از میکروفلور معمول در انواع پنیرهای سنتی (۲۱) و سایر غذاهای تخمیر شده (۲۲،۲۳) در نظر گرفته می‌شوند. در مطالعه حاضر، باکتری انتروکوک از درصد نسبتاً زیادی (۷۴٪) از پنیرهای کوزه در این مطالعه جداسازی شدند. تا کنون یافته‌های مشابه‌ای در مورد حضور بالای انتروکوک‌ها در پنیرهای مختلف سنتی بدست آمده است از جمله تعداد انتروکوکوس‌ها در چند مطالعه انجام گرفته در کشور ترکیه در محدوده ۶۲ تا ۹۹ درصد ثبت شده است (۲۴). در بررسی مهدوی و همکاران نیز ۹۵ درصد پنیرهای کوزه حاوی انتروکوک تشخیص داده شد (۲۵).

در این تحقیق به منظور جداسازی انتروکوک‌ها از پنیرهای کوزه از محیط کشت KAA Agar استفاده شد و با بکارگیری آزمون‌های تکمیلی، تعداد ۹۴ پرگنه از ۱۱۱ پرگنه مشکوک در این محیط کشت (۸۴/۷٪) به عنوان انتروکوک تأیید شدند. قابلیت بالای محیط کشت KAA Agar در جداسازی باکتری‌های انتروکوکوس از محصولات لبنی در مطالعات دیگر نیز اثبات شده است (۲۲،۲۶،۲۷).

فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند از رشد و تکثیر انواع پاتوژن‌ها در محصولات تخمیری سنتی در طول دوره رسیدن آن‌ها ممانعت کند (۲۸،۲۹). یافته‌های اکثر مطالعات بر اثرات ضد میکروبی قوی‌تر باکتری‌های لاکتیک بر علیه باکتری‌های گرم مثبت اشاره دارد (۳۰). جدایه‌های انتروکوک در این تحقیق نیز اثرات ضد لیستریایی بارزی از خود نشان دادند (۸۳/۷٪). آن‌ها همچنین اثر آنتاگونیستی ضعیف‌تری روی *باسیلوس سرئوس* داشتند (۲۵/۵٪). در مطالعات دیگر هم بر اثرات قوی ضد میکروبی انتروکوک‌های جداسازی شده از منابع مختلف علیه *لیستریا مونوسایتوجنز* اشاره شده است

(۲۷،۳۱،۳۲). برخی از باکتری‌های انتروکوک جداسازی شده از پنیر کوزه برضد باکتری گرم منفی *اشریشیا کولای* نیز مؤثر بودند (۵ مورد). این اثرات با یافته‌های محققین دیگر در این مورد توافق دارد (۱۶،۳۳). در برخی از مطالعات به طیف ضد میکروبی وسیع‌تر انتروکوک‌ها نیز اشاره شده است (۳۴). جدایه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* سویه C در پنیرهای سنتی زرد در استان کرمان بیشترین اثرات ضد میکروبی علیه *لیستریا مونوسایتوجنز* و *سودوموناس آیروچینوزا* را داشتند (۳۵) و یا انتروکوک‌های جداسازی شده از منطقه مغان و مشگین‌شهر در کشورمان دارای اثرات ضد میکروبی بر ضد *اشریشیا کولای*، *لیستریا اینوکوا* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* بودند (۳۶).

حساسیت بالای جدایه‌های انتروکوک به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های رایج بالینی در این مطالعه با یافته‌های دیگر محققین در خصوص مقاومت پائین انتروکوک‌های جداسازی شده از انواع مختلف پنیرها هم‌خوانی دارد (۱۳،۳۷،۳۸) و نشان می‌دهد که انتروکوک‌های جداسازی شده از پنیرهای سنتی را نمی‌توان به عنوان منابع بالقوه برای انتشار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در نظر گرفت. بالای ۸۰ درصد از جدایه‌های انتروکوک در مطالعه حاضر به ۸ آنتی‌بیوتیک مورد مطالعه از جمله ونکومایسین حساس بودند. در تحقیقات دیگری هم حساس بودن انتروکوک‌های جداسازی شده از منشاء لبنیات به ونکومایسین گزارش شده است. حساسیت به وانکومایسین مطلوب است زیرا انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین اخیراً به عنوان یک علت رایج و مکرر عفونت‌های انسانی ظاهر شده‌اند. (۱۶،۲۴،۳۹)

هیچ‌یک از ایزوله‌های انتروکوک در این مطالعه خاصیت همولیتیکی نداشتند. از آنجا که فعالیت همولیتیک باکتری‌ها می‌تواند سلول‌های اپیتلیال روده را تخریب نماید، فقدان این ویژگی برای باکتری‌هایی که در غذاها (به‌عنوان استارتر یا پروبیوتیک و ...) به کار می‌روند از اهمیت زیادی برخوردار است (۱۸).

نتیجه‌گیری

بکارگیری انتروکوک‌ها در غذاها به دلیل شواهد مبتنی بر بیماری‌زایی و مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی آن‌ها همیشه مورد بحث و تردید بوده است. با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان بیان کرد که پنیر سنتی کوزه منبع غنی از باکتری انتروکوک است که دارای فعالیت ضد میکروبی به‌ویژه علیه *لیستریا مونوسیژنر* هستند. این جدایه‌ها همچنین به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های مهم، به خصوص ونکومایسین حساس بودند. در صورت مطالعه جنبه‌های بیشتر ایمنی مانند بررسی وجود فاکتورهای حدت و بیماری‌زا در این جدایه‌ها و همچنین ارزیابی دیگر خواص پروبیوتیکی از

جمله مقاومت به اسید و صفرا، می‌توان از این جدایه‌های انتروکوک به‌عنوان منبع باکتری‌های پروبیوتیک بومی در دیگر محصولات تخمیری نیز استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته‌شده از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سراب با کد MS-1546 می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافی ندارند.

References

- 1- Johnson M. A 100-Year Review: Cheese production and quality. *Journal of Dairy Science*. 2017; 100(12): 9952-9965.
- 2- Hasanzadeh A, Raftani Amiri Z and Aminifar M. Changes in the physicochemical, microstructural and rheological properties of traditional Kope cheese during ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2018; 71(2): 347-355.
- 3- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K and Hammami R. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-An update. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9: 1791.
- 4- Ghaderi M, Azizi A, Ezzatpanah H, Hejazi MA and Hemmasi AH. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria in Traditional Pot Cheese. *Journal of Agricultural Engineering Research*. 2013; 14(3): 83-96. [In Persian]
- 5- Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 88(2-3): 215-222.
- 6- García-Solache M and Rice LB. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. *Clinical Microbiology Reviews* 32 (2): 2019; e00058-18.
- 7- Gomes BC, Esteves CT, Palazzo IC, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*. 2008; 25(5): 668-675.
- 8- Domingos-Lopes M, Stanton C, Ross P, Dapkevicius M and Silva C. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*. 2017; 63: 178-190.
- 9- Rasouli Pirouzian H, Hesari J, Farajnia S, Moghaddam M and Ghiassifar Sh. Isolation and identification of dominant strains of enterococci in traditional lighvan cheese. *Journal of Food Research*. 2009; 19(1): 13-24. [In Persian]
- 10- Nami Y, Vaseghi Bakhshayesh R, Mohammadzadeh Jalaly H, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA. Probiotic properties of *Enterococcus* isolated from artisanal dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10:300.
- 11- Demirgöl F, Tuncer Y. Detection of antibiotic resistance and resistance genes in enterococci isolated from sucuk, a traditional Turkish dry-fermented sausage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. 2017; 37(5): 670-681.

- 12- Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control*. 2008; 19(9): 886-892.
- 13- Alves PI, Martins MP, Semedo T, Marques JJF, Tenreiro R, Crespo MTB. Comparison of phenotypic and genotypic taxonomic methods for the identification of dairy enterococci. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2004; 85(3): 237-252.
- 14- Rahimi F, Talebi M, Seyfi M, Pourshafiei M. Distribution of enterococcal species and detection of vancomycin resistance genes by multiplex PCR in Tehran sewage. *Iranian Biomedical Journal*. 2007; 11(3): 161-167.
- 15- Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Zadi TM, Kuliyevev A, et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*. 2013; 30(2): 631-641.
- 16- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*. 1998; 51(4): 123-136.
- 17- Angmo K, Kumari A, Bhalla TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*. 2016; 66: 428-435.
- 18- Hassanzadazar H, Mardani K, Yousefi M, Ehsani A. Identification and molecular characterisation of lactobacilli isolated from traditional Koopeh cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2017; 70(4): 556-561.
- 19- Kafili T, Razavi SH, Djomeh ZE, Naghavi MR, Álvarez-Martín P, Mayo B. Microbial characterization of Iranian traditional Lighvan cheese over manufacturing and ripening via culturing and PCR-DGGE analysis: identification and typing of dominant lactobacilli. *European Food Research and Technology*. 2009; 229(1): 83-92.
- 20- Saavedra L, Taranto MaPa, Sesma F, de Valdez GF. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 88(2-3): 241-245.
- 21- Morandi S, Brasca M, Andrighetto C, Lombardi A, Lodi R. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal*. 2006; 16(8): 867-875.
- 22- Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Palop L. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*. 2011; 28(5): 891-899.
- 23- Sanlibaba P, Senturk E. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of enterococci from traditional cheeses in Turkey. *International Journal of Food Properties*. 2018; 21(1): 1955-1963.
- 24- Mahdavi S, Alilou S, Shafiei Y. Isolation and identification of *Enterococcus* species from fresh and pot cheeses in Khoy area. *Journal of Food Hygiene*. 2016; 6(23): 77-91. [In Persian]
- 25- Ingham SC, Reyes JC, Schoeller NP, Lang MM. Potential use of presumptive enterococci and staphylococci as indicators of sanitary condition in plants making hard Italian-type cheese. *Journal of Food Protection*. 2000; 63(12): 1697-1701.
- 26- Yerlikaya O, Akbulut N. In vitro characterisation of probiotic properties of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* strains isolated from raw milk and traditional dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 2020; 73(1): 98-107.
- 27- Uraipan S, Hongpattarakere T. Antagonistic characteristics against food-borne pathogenic bacteria of lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from feces of healthy Thai infants. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2015; 8(6): 18264.
- 28- Ogier JC, Serror P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 2008; 126(3): 291-301.
- 29- Hossain MI, Sadekuzzaman M, Ha SD. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. *Food Research International*. 2017; 100: 63-73.
- 30- Hajikhani R, Beyatli Y, Aslim B. Antimicrobial activity of enterococci strains isolated from white cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2007; 60(2): 105-108.

- 31- Lei M, Dai X, Liu M. Biological characteristics and safety examination of five enterococcal strains from probiotic products. *Journal of Food Safety*. 2015; 35(3): 324-335.
- 32- Aguilar C, Vanegas C, Klotz B. Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in milk. *The Journal of Dairy Research*. 2011; 78(2): 136-143.
- 33- Barbosa J, Ferreira V, Teixeira P. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology*. 2009; 26(5): 527-532.
- 34- Tafkiki S, Hanifian S. Inhibitory effect of native enterococci isolates on some of the foodborne bacterial pathogens. *Journal of Food Hygiene*. 2019; 9(33): 35-48. [In Persian]
- 35- Khodaei N, Soltaninajhad S. Isolation and molecular identification of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* C2 with a wide range of antibacterial activity from local Zarand dairy. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*. 2017; 9(34): 49-58. [In Persian]
- 36- Jafari B, Monadi AR, Rezaei, A, Alizadeh S, Ahmadizadeh CH, Barzegari A et al. Evaluation of the probiotic potential of enterococci isolated from traditional dairy products in Moghan and Meshginshahr regions. *Journal of Veterinary clinical Pathology*. 2012; 6 (21): 1505-1513. [In Persian]
- 37- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Duprè I, et al. 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*. 2003; 88(2-3): 291-304.
- 38- Gaglio R, Couto N, Marques C, Lopes MdFS, Moschetti G, Pomba C, et al. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 2016; 236: 107-114.
- 39- Ahmed MO, Baptiste KE. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. *Microbial Drug Resistance*. 2018; 24(5): 590-606.