Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2322 - 2069
Online ISSN: 2322 - 2794

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Evaluation of antimicrobial and antibiotic resistance properties of microbial community in a traditional cheese

Nafiseh Davati[1*]

[1] Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran,
Email: n.davati@basu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2021-10-25
Revised: 2021-12-05
Accepted: 2022-2-23

Keywords:
Enterococcus
Metagenomic
Antibiotics resistance
Antimicrobial
Cheese

ABSTRACT

Background and objectives: The presence of antibiotic-resistant genes in local cheeses is not desirable due to the risk of gene migration, increased resistance to antibiotics in consumers, and therefore no effectiveness of related drugs during the treatment period. Recently, the studies showed that the demand of local cheeses made from raw milk have increased. However, there is a concern that consumption of these cheeses could increase the risk of antibiotic-resistant genes transfer through bacteria especially *Enterococcus* spp. to consumers. Certainly, traditional fermented products may contain intrinsic microbial flora with unique useful properties, including the production of antimicrobial metabolites and resistance to phages, which is very important for the dairy industry. The ability of bacteriocin production by the microbial flora that responsible for fermentation of cheeses obtained from raw milk is very important because it prevents the growth of pathogenic bacteria. Therefore, the aims of this study were the evaluation of the presence of antibiotic-resistant microbial flora of local cheeses made from raw milk and the investigation of their useful properties such as production of antimicrobial metabolites.

Materials and methods: Cheese made from raw milk was produced based on a traditional recipe. For isolation of *Enterococcus* spp., KAA agar was used, followed by incubation for 48 h at 37°C. The serial dilution of cheese was carried out until the final dilution of 10^{-8} in sterile ringer solution. For isolation of *Enterococcus* spp., a 100 µl of diluted sample was cultured on KAA agar, then incubated for 48 h under anaerobic conditions at 37°C. The catalase-negative and Gram-positive isolates were phenotypically distinguished at genus level using physiological tests (growth at salt concentrations 6.5% and 18%, pH 9.6 and 4.4, temperatures 10°C and 45°C and gas production). After phenotypic detection of isolates at genus level, culture-dependent characterization through PCR and subsequently sequencing was carried out. DNA extracted from cheese was proliferated and sequenced by NGS technique. The metagenomics data were processed for phage resistance, antibiotic resistance, bacteriocin and antioxidant components production. Furthermore, antibiotic resistance of isolates and antimicrobial properties of cell free supernatant (CFS) from cheese were evaluated.

Results: A total of 20 bacteria were isolated from cheese and molecularly identified as *Enterococcus malodoratous* (60%), *Enterococcus faecalis* (5%), *Enterococcus duran* (5%), and Enterococcus spp. (30%). Also, the metagenomic analysis showed that Enterococcal community of cheese include *Enterococcus malodoratous* (72%), *Enterococcus faecalis* (6%),

Enterococcus italicus (13%), Enterococcus spp. (10%) and its microbiome was resistance to antibiotics and bacteriophages and had the production potential of antioxidant compounds and antimicrobial compounds such as plantaricin. Moreover, laboratory tests confirmed antibiotics resistance and antimicrobial properties of isolates.

Conclusion: This study showed that some local cheeses can be responsible for transferring antibiotic-resistant genes to humans and consumption of these cheeses should be limited.

Cite this article: Davati, N. 2022. Evaluation of antimicrobial and antibiotic resistance properties of microbial community in a traditional cheese. *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (2), 131-146.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/EJFPP.2022.19620.1685
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

بررسی خواص ضدمیکروبی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جامعه میکروبی یک پنیر سنتی

نفیسه دعوتی[1*]

[1] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، رایانامه: n.davati@basu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۰۸/۰۳
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۰/۰۹/۱٤
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۲/۰٤

واژه‌های کلیدی:
انتروکوکوس
متاژنومیکس
مقاومت آنتی‌بیوتیکی
ضدمیکروبی
پنیر

چکیده

سابقه و هدف: حضور ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پنیرهای محلی، به دلیل خطر مهاجرت ژن‌ها، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مصرف کنندگان و درنتیجه بی‌اثر شدن داروهای مربوطه در طی دوره درمانی مطلوب نیست. اخیرا، مطالعات نشان داده است که تقاضای پنیرهای محلی حاصل از شیر خام افزایش یافته است. به علاوه، این نگرانی وجود دارد که با مصرف این پنیرها امکان انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق باکتری‌ها به خصوص گونه‌های انتروکوکوس به مصرف کنندگان افزایش یابد. البته محصولات تخمیری سنتی ممکن است حاوی فلور میکروبی ذاتی با ویژگی‌های مفید منحصر به فرد شامل تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی و مقاومت به فاژها باشند که برای صنایع لبنی بسیار مهم است. قابلیت تولید باکتریوسین توسط فلور میکروبی مسئول تخمیر پنیرهای حاصل از شیرخام بسیار مهم است زیرا از رشد باکتری‌های بیماری زا جلوگیری می‌کند. از این رو، اهدف این مطالعه بررسی حضور فلور میکروبی مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پنیرهای محلی حاصل از شیر خام و همچنین بررسی خواص مفید آن‌ها از جمله تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی بود.

مواد و روش‌ها: پنیر حاصل از شیر خام براساس یک دستورالعمل سنتی تهیه گردید. برای جداسازی انتروکوکوس‌ها، از محیط KAA آگار و سپس گرمخانه‌گذاری به مدت ٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. رقیق‌سازی پنیر در محلول رینگر استریل تا رقت 10^{-8} انجام شد. جهت جداسازی انتروکوکوس‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده روی KAA آگار کشت گردید و سپس به مدت ٤۸ ساعت تحت شرایط بی هوازی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. جدایه‌های کاتالاز منفی و گرم مثبت توسط تست‌های فیزیولوژی (رشد در نمک با غلظت‌های ٦/۵ درصد و ۱۸درصد، pHهای ۹/٦ و ٤/٤، دماهای ۱۰ و ٤۵ درجه سانتی‌گراد و تولید گاز) به صورت فنوتیپی در سطح جنس شناسایی شدند. بعد از تشخیص فنوتیپی جدایه‌ها در سطح جنس، شناسایی انتروکوکوس‌ها براساس روش مولکولی وابسته به کشت توسط PCR و سپس توالی‌یابی انجام شد. DNA استخراج شده از پنیر توسط تکنیک NGS تکثیر و توالی‌یابی گردید. داده‌های متاژنوم برای ژنوم مقاوم به فاژها و آنتی‌بیوتیک‌ها، قابلیت تولید باکتریوسین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آنالیز شدند. به‌علاوه، مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک و خواص ضد میکروبی عصاره فاقد سلول حاصل از پنیر بررسی شدند.

یافته‌ها: در کل ۲۰ باکتری از پنیر جدا شد و براساس تشخیص مولکولی شامل ٦۰ درصد *انتروکوکوس مالودوراتوس*، ۵ درصد *انتروکوکوس فکالیس*، ۵ درصد *انتروکوکوس دورانس* و ۳۰ درصد سایر گونه-

های انتروکوکوسی بودند. همچنین، آنالیز متاژنومیکس نشان داد که جامعه انتروکوکوسی پنیر شامل ۷۲ درصد *انتروکوکوس مالودوراتوس*، ٦ درصد *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۳ درصد *انتروکوکوس ایتالیکوس* و ۱۰ درصد سایر گونه‌های انتروکوکوسی است و میکروبیوم آن مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتریوفاژها و دارای پتانسیل تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی نظیر پلانتاریسین بود. به‌علاوه، تست‌های آزمایشگاهی نیز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و خواص ضدمیکروبی جدایه‌ها را تایید کرد.

نتیجه گیری کلی: این مطالعه نشان داد که برخی پنیرهای محلی می‌توانند عامل انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به انسان باشند و بایستی مصرف این نوع پنیرها محدود گردد.

استناد: دعوتی، ن. (۱٤۰۱). بررسی خواص ضدمیکروبی و مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جامعه میکروبی یک پنیر سنتی. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱٤ (۲)، ۱٤٦-۱۳۱.

DOI: 10.22069/EJFPP.2022.19620.1685

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

تاریخچه تولید پنیر به‌عنوان یک فرآیند زیست فناوری قدمت بسیار طولانی دارد که به طور تصادفی در اثر ذخیره‌سازی شیر در معده یک حیوان کشتار شده تولید شد و از آن زمان تا امروز از پنیرسازی به عنوان یک روش طبیعی و پایدار برای افزایش زمان ماندگاری شیر استفاده شد (۱). امروزه بخش مهمی از تحقیقات علمی مرتبط با محصولات تخمیری نظیر پنیر به شناسایی تنوع ژنتیکی میکروارگانیسم‌های این محصولات اختصاص دارد. از آن جایی‌که بسیاری از باکتری‌ها قابلیت کشت در شرایط آزمایشگاهی را ندارند، شناخت محدودی از جامعه میکروبی این محصولات داریم که می‌توان با کمک تکنیک‌های پیشرفته مستقل از کشت نظیر متاژنومیکس به درک بهتری دست یافت (۲، ۳). از طریق آنالیز متاژنومیکس محصولات تخمیری می‌توان اطلاعات مفیدی در زمینه ساختار میکروبی و مسیرهای بیوسنتزی آن کسب کرد و امروزه اغلب تحقیقات متاژنومی بر پایه تکنیک‌های نسل جدید توالی‌یابی (NGS[1]) استوار است (٤، ١). معمولا در پنیر، انتروکوکوس‌ها بخشی از میکروبیوتای غالب پنیر حاصل از شیر خام را تشکیل می‌دهند (٥). فراوانی انتروکوکوس‌ها در غذا عمدتاً نتیجه گسترش آن در مکان‌های مختلف محیطی و سازگاری زیاد آن با پارامترهای مختلف اعمال شده در طی فرآوری و نگهداری مواد غذایی است. حضور انتروکوکوس‌ها در پنیر حاصل از شیر پاستوریزه نشان دهنده عدم کفایت حرارتی، آلودگی ثانویه یا تلقیح عمدی در طی فرآیند تولید است (٦). از آن جایی‌که استفاده بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در داروهای انسانی و دامپزشکی، ظهور و گسترش مقاومت‌های اکتسابی به این آنتی‌بیوتیک‌ها را در محیط زیست تسهیل کرده است (٧)، حضور انتروکوکوس در مواد غذایی به‌دلیل انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک خوشایند نیست. گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی (AR[2]) به یک نگرانی اصلی در زمینه سلامت عمومی در سطح جهانی تبدیل شده است، زیرا در صورت حضور ژن‌های AR، اثر داروها برای درمان عفونت‌ها کاهش می‌یابد. یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که انتشار و انتقال AR در محیط‌های تولید و فرآوری مواد غذایی بسیار رخ می‌دهد. اگرچه هنوز روی محتوای ژنومی AR موجود در اکوسیستم‌های غذایی مطالعات کاملی انجام نشده است، اما امکان انتقال این ژن‌ها در حین تولید مواد غذایی یا در هنگام عبور از دستگاه گوارش به میکروارگانیسم‌های فرصت طلب و بیماری زا به وضوح ثابت شده است. تعیین محتوای ژنومی AR موجود در غذاها به شناسایی انواع و میزان ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی موجود در اکوسیستم‌های مختلف غذایی کمک می‌کند (٨). از طرف دیگر با وجود احتمال انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و خواص بیماری‌زایی فلور میکروبی مسئول هر فرایند تخمیری بایستی درنظر داشت که این جامعه میکروبی می‌تواند فواید متعددی از جمله ایجاد عطر و آروما، افزایش ارزش غذایی، بهبود بافت و ماندگاری با تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی برای این نوع محصولات نیز داشته باشد. در شیر و محصولات لبنی به دلیل طبیعت مغذی آن، همواره فرصت رشد تعداد زیادی از باکتری‌های عامل فساد وجود دارد؛ بنابراین همواره استفاده از روش‌های طبیعی و ایمن برای افزایش ماندگاری این محصولات مورد اهمیت بوده است. قابلیت تولید باکتریوسین توسط فلور میکروبی مسئول تخمیر پنیرهای حاصل از شیرخام بسیار مهم است زیرا از رشد باکتری‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. امروزه از باکتریوسین‌ها، پپتیدهای کاتیونی با خاصیت آبگریزی یا آمفیفیلیک، به عنوان نگهدارنده‌های طبیعی

1.Next generation sequencing

2.Antibiotic resistance

ایمن و بی‌خطر به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود و باکتریوسین‌های حاصل از باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB[1]) در نگهداری مواد غذایی جهت مهار رشد عوامل بیماری‌زا و فساد ناشی از مواد غذایی کاربرد فراوانی دارد. به عنوان مثال، نایسین تولید شده توسط *لاکتوکوکوس لاکتیس*، به‌عنوان یک نگهدارنده مواد غذایی در بیش از ۵۰ کشور تأیید شده است تا از فساد پنیرهای فرآوری شده و پنیر ریکوتا توسط باکتری‌های گرم مثبت و بیماری زا جلوگیری کند (۹). همچنین در مطالعات پیشین گزارش شده است که برای کنترل *لیستریا مونوسیتوژنز* در محصولات لبنی، سبزیجات و غذاهای آماده از باکتریوسین‌هایی مانند لوکوسین A و ساکاسین A استفاده می‌شود. هدف از انجام این پژوهش، آنالیز داده‌های متاژنوم فلور میکروبی روی یک پنیر محلی حاصل از شیر خام جهت تشخیص فلور انتروکوکوسی، بررسی محتوای ژنومی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و خواص ضدمیکروبی جامعه میکروبی این پنیر است.

مواد و روش‌ها

تهیه پنیر: جهت تهیه پنیر مطابق با یک دستورالعمل محلی در یکی از روستاهای همدان، به شیر ولرم گاو با دمای حدود ۳۰ درجه سانتی‌گراد، کشت آغازگر مزوفیلیک (*CHR-Hansen* -Denmark) حاوی باکتری‌های *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *لاکتیس*[2] و *لاکتوکوکوس لاکتیس* زیرگونه *کریموریس*[3] افزوده شد. جهت تهیه پنیر از قرص مایه پنیر آنزیمکس (شرکت آنزیم‌های صنعتی، ایران) استفاده شد. پس از گذشت ٤۰ دقیقه (زمان کافی برای افزایش اسیدیته شیر)، ۲۲میلی‌لیتر از محلول رنت (حاوی ۱۰ قرص پنیر) در ۱۰۰ لیتر شیر که در دو ظرف بزرگ ۵۰ لیتری توزیع شده بود اضافه گردید. سپس دلمه‌ها پس از سفت شدن، با چاقو برش و استراحت داده شدند. پس از آب‌گیری کامل، دلمه با نمک خشک مخلوط گردید (حدودا ۱۲ درصد حجم پنیر)، سپس درون پارچه‌ای ریخته شد تا پنیر یک دست و منسجم حاصل شود. در مرحله بعد پنیر را داخل ظرف بزرگی پشت و رو کرده و به مدت ۱۲ ساعت جسم ۲۰ کیلوگرمی روی درب ظرف قرار داده شد و پنیر به‌مدت ۲ تا ۳ روز در جای خشک نگه داشته شد. در مرحله آخر تمام سطوح آن به روغن آفتابگردان آغشته شد و داخل پارچه‌ای نخی بسته‌بندی شد و جهت رسیدگی به مدت ۳ ماه در زیرزمینی با دمای حدود ۱۰-۸ درجه سانتی‌گراد انبار داری گردید.

جداسازی انتروکوکوس‌های دخیل در فرایند رسیدگی پنیر: در طی فرایند رسیدگی در فواصل زمانی ۱۵ روزه، ۱۰۰ گرم پنیر ازسطوح جانبی و مرکزی پنیر تحت شرایط استریل برداشت و توسط‌هاون چینی استریل خرد گردید. رقیق‌سازی نمونه در محلول رینگر استریل تا رقت 10^{-8} انجام شد و از رقت‌های مناسب در محیط‌های KAA آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد. کلیه پلیت‌های تلقیح یافته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۸ ساعت در جار بی‌هوازی حاوی گازپک نوع A گرمخانه‌گذاری شدند. سپس با روش کشت خطی، کلنی‌ها خالص‌سازی شده و جدایه‌های کوکسی کاتالاز منفی و گرم مثبت برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (۱۰).

شناسایی فنوتیپی جنس جدایه‌ها: جهت تشخیص جدایه‌ها تا سطح جنس از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل بررسی توانایی رشد در دو دمای ۱۵ و ٤۵ درجه سانتی‌گراد، pH=٤/٤ و pH=۹/٦، کلرید سدیم

1. Lactic acid bacteria
2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
3. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

با غلظت ٦/٥درصد و عدم قابلیت تولید گاز دی اکسید کربن از گلوکز استفاده گردید (١١، ١٢).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها: جهت استخراج DNA، کلنی جدایه‌های حاصل از محصول نهایی پنیر در ١٠٠ میکرولیتر آب دیونایز استریل حل و ١٠٠ میکرولیتر الکل ایزوآمیل/کلروفرم (٢٤/١) به آن اضافه شد. سوسپانسیون حاصل بعد از ٥ ثانیه ورتکس به مدت ٥ دقیقه در g ١٦٠٠٠ سانتریفوژ شد. سپس از فاز آبی بالایی، DNA برداشت گردید (٥).

جهت تکثیر ژن 16S rDNA از پرایمرهای B27F (5′- (Bioneer, Korea) AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و U1492R (5′-ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′) استفاده شد. محلول واکنش PCR شامل کیت خشک 2X PCR Master (بایورون[1]، آلمان) به همراه ٢µl DNA، ١٦ µl آب استریل فاقد آنزیم DNAse (سیناکلون، ایران)، ١ µl از پرایمرهای B27F و U1492R (با غلظت ١٠ picomole /µl) بود. برنامه دمایی و زمانی توسط دستگاه ترموسایکلر به صورت زیر اجرا گردید. مرحله فعال‌سازی در دمای ٩٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٥ دقیقه، ٣٥ سیکل مراحل واسرشت‌سازی در ٩٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در ٥٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤٥ ثانیه، توسعه در ٧٢ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٢ دقیقه، در نهایت مرحله توسعه نهایی در ٧٢ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ١٠ دقیقه و سرد کردن در ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٥ دقیقه (١٣). سپس محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال گردید.

استخراج DNA و تهیه کتابخانه ژنومی: در پایان ٩٠روز تخمیر، DNA مستقیما از نمونه حاصل از مخلوط لایه‌های مختلف پنیر توسط کیت استخراج DNA از خون و بافت (Qiagen) DNeasy Blood & Tissue Kits (کیاژن، آلمان) و براساس پروتوکل شرکت سازنده استخراج شد. پس از ساخت کتابخانه ژنومی با کمک کیت Nextera™ DNA (ایلومینا، آمریکا)، توالی‌یابی توسط پلتفورم HiSeq® 2000 انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری و متاژنومیکس داده‌ها: داده‌های خام حاصل از توالی‌یابی کامل ژنوم مستخرج از پنیر جهت آنالیز جامعه میکروبی، ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و... توسط نرم‌افزار CLC آنالیز گردید. اثر زمان تخمیر بر تعداد انتروکوکوس‌های شناسایی شده به روش فنوتیپی در فواصل زمانی ١٥ روز با نرم‌افزار SPSS version 16 و آنالیز واریانس یک طرفه با اندازه‌گیری‌های مکرر[2] و معنی‌داری در سطح $p<0.05$ بررسی گردید.

تهیه عصاره عاری از سلول (CFS[3]) پنیر: به منظور به‌دست آوردن CFS (حاوی متابولیت‌های ضد میکروبی)، ٢ گرم پنیر تا حجم ١٠ میلی‌لیتر با سرم فیزیولوژی استریل تعلیق‌سازی و توسط همزن مخلوط و سپس با دور ٧٢٠٠g به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ شد. اثرات ضدمیکروبی متابولیت‌های جامعه میکروبی پنیر مطابق با روش‌های هرروس و همکاران (٢٠٠٥) و کورتز زاولاتا و همکاران (٢٠١٤) بررسی گردید (١٤).

فعالیت‌های ضدباکتری CFS پنیر: در مطالعه ما از *اشرشیاکلی*[4]، *سالمونلا تایفی*[5]، *باسیلوس سرئوس*[6] و *استافیلوکوکوس اورئوس*[7] به عنوان باکتری‌های شاخص استفاده شد. طبق روش کومار و همکاران (٢٠١٦)، فعالیت ضد میکروبی CFS با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار بررسی شد. ١٠ میکرولیتر از CFS به دیسک کاغذی استریل با قطر ٦

1. Bioron

2. One-way ANOVA with repeated measures
3. Cell-free supernatant
4. *Escherichia coli*
5. *Salmonella typhi*
6. *Bacillus cereus*
7. *Staphylococcus aureus*

میلی‌متر اضافه شد و روی محیط مولرهینتون آگار تلقیح یافته با کشت شبانه باکتری‌های شاخص (با غلظت ۰/۵ مک فارلند معادل ($1/5 \times 10^8$ CFU/mL) قرار گرفت و دیسک کنترل با افزودن ۵ میکرولیتر آب استریل تهیه شد. پلیت‌ها در دمای ۲ ± ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و فعالیت ضد میکروبی CFS با کاهش توانایی تشکیل کلنی باکتری‌های شاخص بیماری زا اطراف دیسک تعیین شد (۱۶).

بررسی مقاومت جدایه‌های انتروکوکوسی به آنتی‌بیوتک‌ها: جهت بررسی مقاومت انتروکوکوس‌ها به آنتی‌بیوتک‌های مختلف از کشت شبانه جدایه‌ها به محیط رینگر استریل انتقال داده شد و سپس غلظت آن معادل ۰/۵ مک فارلند تنظیم گردید. با استفاده از سوآپ استریل، جدایه‌ها روی محیط KAA agar به صورت سطحی کشت داده شدند و متعاقبا دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین[1]، آمپیسیلین[2]، پنیسیلین[3]، اگزاکسیلین[4]، اریترومایسین[5]، کلرامفنیکول[6] و ونکومایسین[7] روی سطح محیط تلقیح یافته قرار گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند. رشد جدایه‌ها اطراف دیسک‌ها نشان‌گر مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها است (۱۷).

نتایج و بحث

شناسایی گونه‌های انتروکوکوسی در جامعه میکروبی پنیر: براساس شکل ۱، تغییرات جمعیت جنس انتروکوکوس در پنیر برای ماه اول رو به افزایش و سپس تا پایان رسیدگی رو به کاهش بود و این تغییرات در طی رسیدگی پنیر معنی‌دار نبود. مشابه مطالعه ما فاکس و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که جمعیت انتروکوکوسی در طی ماه اول رسیدگی پنیر افزایش می‌یابد و سپس تا پایان دوره رسیدگی رو به کاهش است (۱۸).

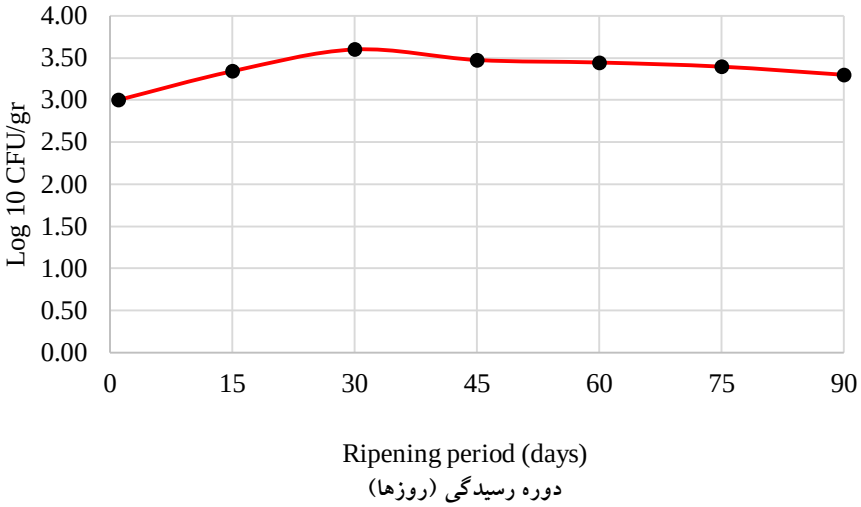
نتایج شناسایی مولکولی وابسته به کشت، براساس بلاست کردن توالی‌ها در NCBI، برای جنس‌های انتروکوکوسی جدا شده از محصول نهایی پنیر به شرح زیر می‌باشد: ۶۰ درصد *انتروکوکوس مالودوراتوس*[8]، ۵ درصد *انتروکوکوس فکالیس*[9]، ۵ درصد *انتروکوکوس دورانس*[10] و ۳۰ درصد سایر گونه‌های انتروکوکوسی[11].

گونه‌های غالب انتروکوکوسی در محصول نهایی پنیر براساس نتایج شناسایی موکولی مستقل از کشت (شکل ۲) حاصل از آنالیز داده‌های متاژنومی به شرح زیر تعیین شد: ۷۲ درصد *انتروکوکوس مالودوراتوس*، ۶ درصد *انتروکوکوس فکالیس*، ۱۲ درصد *انتروکوکوس ایتالیکوس*[12] و ۱۰درصد سایر گونه‌های انتروکوکوسی. در مقایسه دو روش شناسایی مولکولی مستقل و وابسته به کشت، با کمی اختلاف جزئی نتایج تقریبا یکسانی به دست آمد. این تفاوت اندک می‌تواند به دلیل عدم بازیابی و کشت برخی گونه‌ها نظیر *انتروکوکوس ایتالیکوس* توسط روش مولکولی وابسته به کشت باشد اما در روش مستقل از کشت، به دلیل استخراج DNA تام از نمونه غذایی، حتی باکتری‌های غیرقابل بازیابی توسط کشت نیز شناسایی می‌شوند (۲، ۱۹). از طرف دیگر، گونه *انتروکوکوس دورانس* توسط آنالیز متاژنومیکس قابل شناسایی نبود

1. Tetracycline
2. Ampicillin
3. Penicillin
4. Oxacillin
5. Erythromycin
6. Chloramphenicol
7. Vancomycin

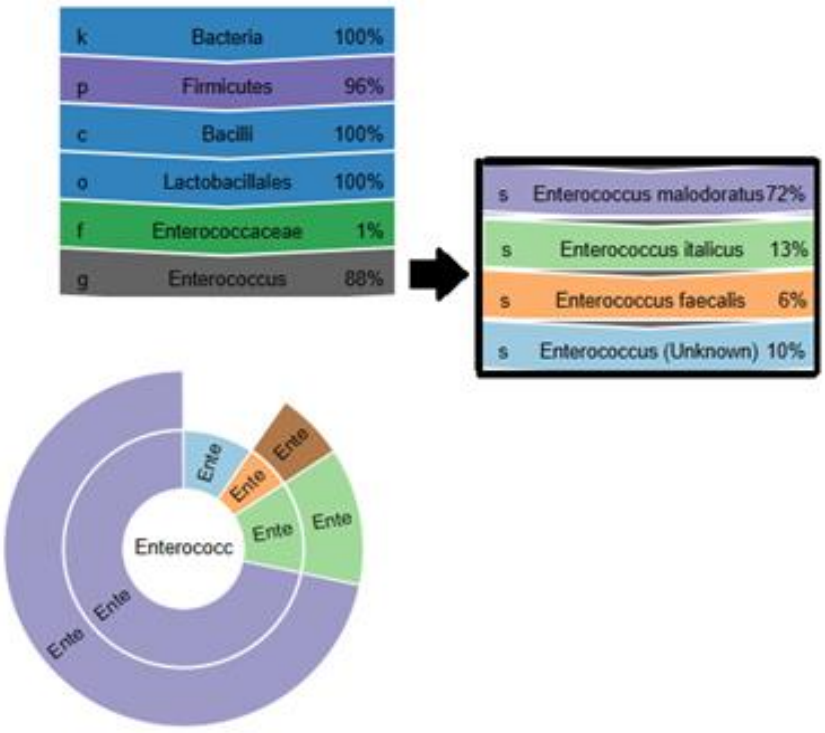
8. *Enterococcus malodoratous*
9. *Enterococcus faecalis*
10. *Enterococcus duran*
11. *Enterococcus* spp.
12. *Enterococcus italicus*

که می‌تواند به دلیل عدم تفکیک آن در سطح گونه و قرار گرفتن آن در ۱۰ درصد سایر گونه‌های انتروکوکوسی شناسایی نشده باشد. در مطالعات متعددی مشابه نتایج ما، حضور انتروکوکوس‌ها توسط آندریگتو و همکاران (۲۰۰۱) در پنیرهای ایتالیایی، جورکوویک و همکاران (۲۰۰۶) در پنیر برینزا و حاجیخانی و همکاران (۲۰۲۱) در پنیر سفید گزارش شد (۲۰، ۲۱).



شکل ۱- تغییرات انتروکوکوس‌ها در طی رسیدگی پنیر

Figure 1. Change of Enterococcus spp. during cheese ripening.



شکل ۲- گونه‌های انتروکوکوسی غالب شناسایی شده توسط متاژنومیکس در پنیر.

Figure 2. Dominant *Enterococcus* spp. identified using metagenomic in cheese.

بررسی وجود محتوای ژنومی مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها: نتایج آنالیز متاژنومیکس داده‌های حاصل از نسل جدید توالی‌یابی در جدول ۱ و شکل ۳ نشان داده می‌شود. براساس نتایج ثبت شده در سایت https://www.uniprot.org حضور ژن‌های TetM, TetS, tetW, ADC, OXA beta-lactamase, ADC beta-lactamase without carbapenemase activity, adeN که در آنالیز محتوای ژنومی فلور میکروبی پنیر مورد مطالعه ما تایید شده بود، همگی در این سایت برای گونه‌های انتروکوکوسی گزارش شده است.

ژن‌های TetM, TetS, tetW اثر بازدارندگی تتراسیکلین بر سنتز پروتئین[1] در باکتری، که با اصلاح پیوندهای غیرکووالانسی ترکیبات ریبوزومی انجام می‌شود، را مهار می‌کنند. براساس نتایج ثبت شده در این سایت، TetS در *انتروکوکوس فکالیس*، *انتروکوکوس دورانس* و سایر گونه‌های انتروکوکوسی و ژن‌های TetM, tetW, OXA beta-lactamase, ADC beta-lactamase, adeN در گونه‌های مختلف انتروکوکوسی گزارش شده است.

در میان ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی[2]، حضور ژن‌های ADC, OXA beta-lactamase دراین آنالیز تایید شد که قبلا به‌طور خاص ADC در *انتروکوکوس فکالیس* گزارش شده بود. آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتامی حاوی حلقه بتالاکتام در ساختار مولکولی خود هستند و شامل پنی‌سیلین، سفالوسپورین‌ها، سفامایسین‌ها، مونوباکتام‌ها، کارباپنم‌ها و کارباسفم‌ها[3] می‌باشند (۲۳). همچنین در بین ژن‌های تنظیم کننده دوجزئی که در جریان خروجی آنتی‌بیوتیک‌ها اثر تعدیل کنندگی دارد[4]، حضور ژن adeN مربوط به انتروکوکوس‌ها تایید شد.

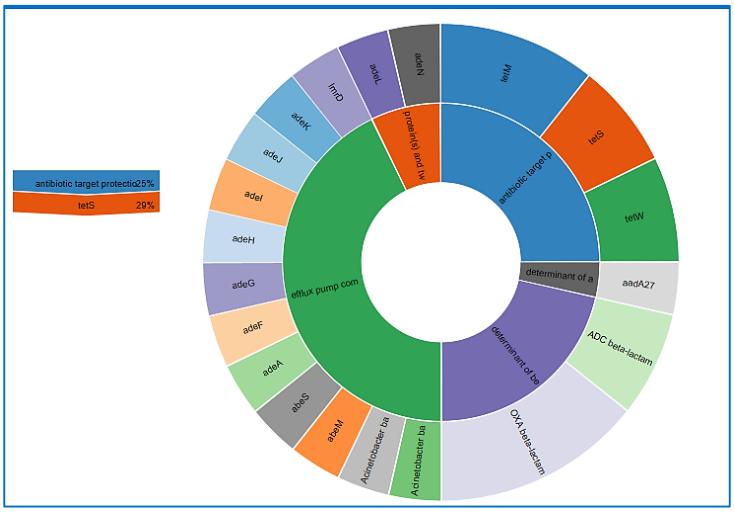
ژن‌های lmrD, adeA, AbaQ, adeK, adeJ, adeI, adeG, adeH, adeF, abeS, abeM, AbaF مربوط به پروتئین‌های مسئول جریان خارجی سلولی است[5] که آنتی‌بیوتیک‌ها را به محیط خارج پمپ می کنند و باعث ایجاد مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. حضور ژن‌های AbaF و AbaQ مربوط به *اسینتوباکتر بائومانی*[6] و lmrD مربوط به *لاکتوکوکوس لاکتیس*[7] در این مطالعه تایید شد که این باکتری‌ها در مطالعات قبلی توسط آنالیزهای دیگر داده‌های متاژنومیکس همین پنیر گزارش شده بود (۲٤). نتایج بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های انتروکوکوسی که از پنیر جدا و توسط روش مولکولی وابسته به کشت شناسایی شده بودند (شکل ٤) نشان داد که این گونه‌ها به آنتی بیوتیک‌های ونکومایسین، تتراسایکلین، آمپی‌سیلین، پنیسیلین، اگزاکسیلین، اریترومایسین و کلرامفنیکول مقاوم هستند زیرا به‌دلیل محتوای ژنومی (جدول ۱) قادر به رشد در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک هستند. بنابراین هر دو تشخیص برپایه کشت جدایه‌ها در حضور آنتی‌بیوتیک‌ها و آنالیز متاژنومیکس نتایج مشابه و تکمیل‌کننده‌ای را نشان داد.

1. Antibiotic target protection protein
2. Determinant of beta-lactam resistance
3. Penicillin derivatives, cephalosporins and cephamycins, monobactams, carbapenems and carbacephems
4. Protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux
5. Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance
6. *Acinetobacter baumannii*
7. *Lactococcus lactis*

جدول ۱- نتایج آنالیز متاژنومیکس روی مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها.

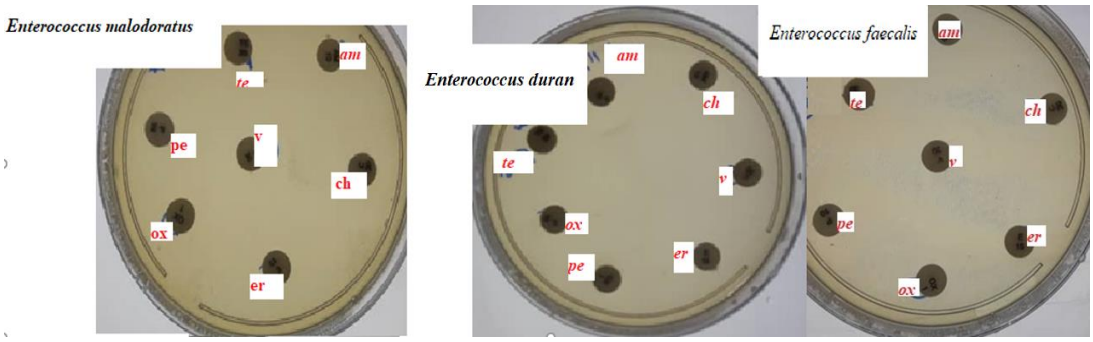
Table 1. Results of metagenomics analysis on antibiotic resistance of bacteria

Classification	Confers Resistance To
Antibiotic target protection protein; tetW, tetM, tetS	tetracycline, doxycycline, minocycline, chlortetracycline, demeclocycline, oxytetracycline, tetracycline antibiotic
Determinant of beta-lactam resistance; ADC beta-lactamase without carbapenemase activity	cephalosporin
Determinant of beta-lactam resistance; OXA beta-lactamase	cephalosporin, penam
determinant of aminoglycoside resistance; aadA27	spectinomycin, streptomycin, aminoglycoside antibiotic
Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance; lmrD	lincosamide antibiotic, macrolide antibiotic, fluoroquinolone antibiotic, cephalosporin, penam, tetracycline antibiotic, peptide antibiotic, acridine dye, rifamycin antibiotic, pleuromutilin antibiotic, nitroimidazole antibiotic
Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance; *Acinetobacter baumannii* AbaF	fosfomycin, macrolide antibiotic, fluoroquinolone antibiotic, lincosamide antibiotic, cephalosporin, glycylcycline, bicyclomycin, penam, nucleoside antibiotic, tetracycline antibiotic, peptide antibiotic, acridine dye, oxazolidinone antibiotic, rifamycin antibiotic, diaminopyrimidine antibiotic, phenicol antibiotic, isoniazid, benzalkonium chloride, rhodamine, antibacterial free fatty acids, nitroimidazole antibiotic
Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance; *Acinetobacter baumannii* AbaQ	fluoroquinolone antibiotic, macrolide antibiotic, lincosamide antibiotic, fosfomycin, cephalosporin, glycylcycline, bicyclomycin, penam, nucleoside antibiotic, tetracycline antibiotic, peptide antibiotic, acridine dye, oxazolidinone antibiotic, rifamycin antibiotic, diaminopyrimidine antibiotic, phenicol antibiotic, isoniazid, benzalkonium chloride, rhodamine, antibacterial free fatty acids, nitroimidazole antibiotic
Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance; adeK, adeJ, adeI, adeG, adeH, adeF, adeA.	antibiotic molecule
Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance; abeS	erythromycin, novobiocin, macrolide antibiotic, aminoglycoside antibiotic, tetracycline antibiotic, aminocoumarin antibiotic, phenicol antibiotic
Efflux pump complex or subunit conferring antibiotic resistance; abeM	ciprofloxacin, acriflavine, norfloxacin, ofloxacin, fluoroquinolone antibiotic, triclosan, glycylcycline, tetracycline antibiotic, acridine dye
Protein(s) and two-component regulatory system modulating antibiotic efflux; adeN, adeL	antibiotic molecule



شکل ۳- نمودار محتوای ژنوم مقاومت به آنتی بیوتیک (tetW, tetM, tetS: پروتئین مقاوم به تتراسایکلین).

Figure 3. Pie chart of genome content of antibiotics resistance.



شکل ٤- مقاومت آنتی‌بیوتیکی گونه‌های انتروکوکوسی

ox: اگزاکسیلین، er: اریترومایسین، te: تتراسایکلین، am: آمپیسیلین، pe: پنیسیلین، ch: کلرامفنیکول، v: ونکومایسین

Figure 4. Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp.
ox: Oxacillin, er: Erythromycin, te: Tetracycline, am:Ampicillin, pe: Penicillin, ch: Chloramphenicol, v: Vancomycin

مشابه نتایج تحقیق ما و مطالعات زیادی در دنیا نشان می‌دهد که سویه‌های لاکتیکی جدا شده از محصولات لبنی تخمیری، بخصوص پنیر، دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌باشند که در اینجا به چند مطالعه اشاره می‌شود.

جمت و همکاران در سال ۲۰۱۲ پروفایل مقاومت آنتی بیوتیکی *انتروکوکوس فکالیس* در ۱۲٦ پنیر فرانسوی تهیه شده از فروشگاه‌های خرده فروشی را مورد بررسی قرار دادند و توانستند حضور انتروکوکوس را در ٤٤ درصد از پنیرهای حاصل از شیر پاستوریزه و ۹۲ درصد از پنیرهای حاصل از شیر خام تشخیص دهند. *انتروکوکوس فکالیس* (۸۱ درصد) به عنوان گونه غالب مقاوم به آنتی‌بیوتیک و به دنبال آن *انتروکوکوس فاسیوم* (۱۳٪) و انتروکوکوس دورانس (٦٪) این فلور میکروبی را تشکیل دادند. آنها در این مطالعه شایع‌ترین مقاومت‌های آنتی بیوتیکی شامل تتراسایکلین (Tet) و مینوسایکلین (Min) و به دنبال آن اریترومایسین (Ery)، کانامایسین (Kan) و کلرامفنیکل (Cm) را مطالعه کردند و حضور ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک را با تکثیر توسط PCR ثابت کردند (٦).

راسوآ و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه‌ای، انتروکوکوس‌های جدا شده در مراحل اولیه و آخر رسیدگی از انواع پنیر PDO Ragusano و Pecorino Siciliano را جهت شناسایی فنوتیپی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه *انتروکوکوس دورانس*، *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* عمده‌ترین گونه‌های شناسایی شده بودند و تا ۹۷ درصد سویه‌ها مقاومت زیادی به ریفامپیسین، اریترومایسین و آمپی‌سیلین نشان دادند. آنالیز PFGE برای *انتروکوکوس دورانس* و *انتروکوکوس فکالیس* حاصل از دو نوع پنیر، ارتباط بین انتروکوکوس‌ها و منطقه جغرافیایی تولید پنیر را ثابت کرد. همچنین آن‌ها بیان داشتند که همواره نگرانی در مورد نقش احتمالی انتروکوکوس‌های لبنی به‌عنوان مخازنی از ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک وجود دارد (۳).

دلگادو و همکاران (۲۰۱۱) روشی را برای تشخیص ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک (AR) در پنیر بر اساس ترکیبی از PCR مالتی پلکس و سیستم ترکیبی ریزآرایه DNA مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه ثابت شد دو ژن مقاوم به تتراسایکلین شامل tet (M) و tet (S) در یک سری پنیرهای تولیدی در واحدهای کوچک وجود دارد، در حالی که ژن‌های aadE، aphA3، ermB، tet (L) و tet (O) به ندرت شناسایی شدند. این روش به‌عنوان ابزاری مفید جهت

شناسایی ژن‌های AR در غذاها پیشنهاد شد (۸). فلورز و همکاران (۲۰۰۸) مقاومت به تتراسایکلین را در دو سویه *لاکتوباسیلوس لاکتیس* جدا شده از یک پنیر تهیه شده بدون استارتر صنعتی بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که وجود ژن‌های اکتسابی مقاوم به آنتی بیوتیک در باکتری‌های مواد غذایی، مقاومت آنتی بیوتیکی سویه‌های استارتر را می‌تواند توجیه کند (۷). براساس نتایج هستی‌شناسی (GO) در آنالیز متاژنومیکس (جدول ۲ و شکل ٤) و تفسیر آن توسط بانک‌های اطلاعاتی زیر

https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term;
https://www.ebi.ac.uk/GOA/Keyword2GO;
https://www.uniprot.org/uniprot/P80214;
http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology/GO:0017144;
https://www.uniprot.org/uniprot/P80214.

علاوه بر حضور ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (GO:0046677)، قابلیت‌های دیگری از جمله فعالیت‌های ضدمیکروبی (GO:0006952, GO:0042742, GO:0098542, GO:0005576)، باکتریوفاژی (GO:0009615, GO:0051607) و آنتی‌اکسیدانی (GO:0016209) در جامعه میکروبی پنیر مورد مطالعه آشکار شد.

جدول ۲- آنالیز هستی شناسی ژن‌ها در جامعه میکروبی پنیر.

Table 2. Ontology analysis of genes in cheese microbial community

Biological function	GO id biological
Defense response: antimicrobial peptide activity | defence response/ Reactions, triggered in response to the presence of a foreign body or the occurrence of an injury, which result in restriction of damage to the organism attacked or prevention/recovery from the infection caused by the attack.	GO:0006952
Defense response to bacterium: (plantaricin; *Lactobacillus plantarum*-Bacteriocin plantaricin-A; Reactions triggered in response to the presence of a bacterium that act to protect the cell or organism.	GO:0042742
Extracellular region: Bacteriocin plantaricin ASM1; *Lactobacillus plantarum*	GO:0005576
Defense response to other organism: Reactions triggered in response to the presence of another organism that act to protect the cell or organism from damage caused by that organism.	GO:0098542
Response to antibiotic: antibiotic susceptibility/resistance: Any process that results in a change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of an antibiotic stimulus.	GO:0046677
Response to virus: Any process that results in a change in state or activity of a cell or an organism (in terms of movement, secretion, enzyme production, gene expression, etc.) as a result of a stimulus from a virus.	GO:0009615
Defense response to virus: Reactions triggered in response to the presence of a virus that act to protect the cell or organism	GO:0051607
Decarboxylase // carboxy-lyase activity: Enzyme that belongs to the lyase family and which catalyzes the spliting of $CO(_2)$ from the carboxylic group of amino acids, beta-keto acids and alpha-keto acids.	GO:0016831
Molecular function	**GO id molecular**
Antioxidant activity: Inhibition of the reactions brought about by dioxygen (O_2) or peroxides. Usually, the antioxidant is effective because it can itself be more easily oxidized than the substance protected. The term is often applied to components that can trap free radicals, thereby breaking the chain reaction that normally leads to extensive biological damage.	GO:0016209

بررسی خاصیت ضدمیکروبی CFS حاصل از پنیر علیه ٤ باکتری شاخص *اشرشیاکلی*، *سالمونلا تایفی*، *باسیلوس سرئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که متابولیت‌های متعدد میکروبی با فعالیت آنتاگونیستی حاصل از فلور میکروبی پنیر در این عصاره وجود دارد. براساس نتایج متاژنومیکس بخش

عمده این پتانسیل مربوط به باکتریوسین‌ها (GO:0006952) به خصوص پلانتاریسین (GO:0042742, GO:0005576) و سایر سیستم‌های دفاعی (GO:0098542) می‌باشد.

پلانتاریسین به عنوان یک ترکیب ضدمیکروبی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[1] تولید می‌شود که قبلاً حضور این باکتری توسط آنالیزهای دیگر داده‌های متاژنومیکس همین پنیر تایید شده بود (۲۴). امروزه مصرف باکتریوسین‌ها به‌عنوان جایگزین‌های طبیعی مناسب برای نگهدارنده‌های شیمیایی در محصولات لبنی توصیه می‌شود (۹). در مطالعه‌ای، ترجو و همکاران (۲۰۲۱) تولید باکتریوسین توسط جدایه‌های لاکتیکی پنیر را تایید کردند (۱). منگ و همکاران (۲۰۲۱) در مطالعه‌ای، با بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتیکی کومیس نشان دادند که این سویه فعالیت بازدارندگی قابل توجهی در برابر رشد *اشرشیاکلی*، *سدوموناس فلورسنس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسپرژیلوس نایجر* و *آسپرژیلوس فلاووس* دارد. همچنین در این مطالعه یک ژن باکتریوسین کلاس III فعالیت ضد میکروبی قوی علیه عوامل بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی نظیر *اشرشیاکلی*، *سالمونلا*، *لیستریا*، *استافیلوکوکوس* و *انتروباکتر* نشان داد. این باکتریوسین دارای ثبات قابل توجه حرارتی تا دمای ۶۰°C و فعالیت ضد میکروبی در دامنه pH= ۳–۸ بود و می‌تواند کاربرد بسیار گسترده‌ای در فراوری مواد غذایی داشته باشد. براساس نتایج، این باکتریوسین به دیواره سلولی آسیب زده و با اختلال در ساختار غشایی باعث نشت ATP داخل سلولی می‌شود (۹).

دو ویژگی دیگر شناسایی شده در آنالیز متاژنوم پنیر مورد مطالعه ما شامل مقاومت به فاژ و خاصیت آنتی‌اکسیدانی فلور لاکتیکی در مطالعات متعددی در دنیا بررسی شده است از جمله دوبیکوا و همکاران (۲۰۱۵) که سیستم‌های مقاوم به فاژ را در جامعه لاکتیکی پنیر برینزا تایید کردند (۲۵). همچنین ویرتانین و همکاران، ۲۰۰۷ نشان دادند که می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصولات تخمیری شیر نظیر پنیر را توسط باکتری‌های اسید لاکتیک تقویت کرد (۲۷). در این زمینه ایسحاق و همکاران (۲۰۲۰) فعالیت آنتی‌اکسیدانی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیک جدا شده از پنیر هورود را تایید کردند (۲۰) و گوپتا و همکاران (۲۰۰۹)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پنیر چدار در مراحل مختلف تخمیر را بررسی کردند (۲۷).

نتیجه‌گیری کلی

حضور ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در پنیر محلی مورد مطالعه ما، به دلیل خطر مهاجرت ژن‌ها، افزایش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در مصرف کنندگان و درنتیجه بی اثر شدن داروهای مربوطه در طی دوره درمانی مطلوب نبوده و بایستی مصرف این نوع پنیرها محدود گردد. از طرف دیگر مقاومت به فاژها به همراه تولید باکتریوسین از مزایای یک کشت آغازگر خوب می‌باشد که براساس نتایج آنالیز متاژنومیکس، علاوه بر وجود ژن‌های مربوط به این عملکردها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز در جامعه میکروبی پنیر مورد مطالعه تایید شد. در نتیجه‌گیری کلی، این مطالعه نشان داد که پنیرهای محلی می‌توانند عامل انتقال ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به انسان باشند هرچند که فلور لاکتیکی آن می‌تواند به فاژها مقاوم بوده و دارای خواص مفیدی از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی باشند. در مطالعات بعدی، بررسی حضور ژن‌های مفید مورد اشاره در هریک از جدایه‌های حاصل از پنیر پیشنهاد می‌گردد تا بتوان از طریق مهندسی ژنتیک از آن‌ها در کشت‌های آغازگر صنعتی بهره برد.

1.*Lactobacillus plantarum*

References

1.Trejo-González, L., Gutiérrez-Carrillo, A. E., Rodríguez-Hernández, A. I., del Rocío López-Cuellar, M. and Chavarría-Hernández, N. 2021. Bacteriocins Produced by LAB Isolated from Cheeses within the Period 2009–2021: a Review. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 1-14.

2.Darvishi, F. 2017. Screening of New Microorganisms and Their Useful Genes: From Traditional Methods to Metagenomics. Iranian journal of biology. 1: 1. 43-51.

3.Russoa, N., Caggiaa, C., Pinoa, A., Coqueb, T.M., and Ariolie, S. 2018. Enterococcus spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: A snapshot of their antibiotic resistance distribution. Food and Chemical Toxicology. 120. 277-286.

4.Kamilaria, E., Dimitrios, A., Papademasa, P., Kamilarisb, A. and Tsaltas, D. 2020. Characterizing Halloumi cheese's bacterial communities through metagenomic analysis. LWT - Food Science and Technology. 126:109298.

5.Ruiz-Barba, J.L., Maldonado, A. and Jiménez-Díaz, R. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical biochemistry. 347: 2. 333-5.

6.Jamet, E., Akary, E., Poisson, M.A., Chamba, J.F., Bertrand, X. and Serror, P. 2012. Prevalence and characterization of antibiotic resistant Enterococcus faecalis in French cheeses. Food Microbiology. 31.191-198.

7.Flórez, A.B., Ammor, M.S., and Mayo, B. 2008. Identification of tet (M) in two Lactococcus lactis strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. International Journal of Food Microbiology. 121. 189-194.

8. Delgado, S., Fracchetti, F., Mayo, B. and Torriani, S. 2011. Development and validation of a multiplex PCR-based DNA microarray hybridisation method for detecting bacterial antibiotic resistance genes in cheese. International dairy Journal. 21: 3.149-157.

9. Meng, F., Zhu, X., Zhao, H., Nie, T., Lu, F. Lu, L. and Lu, Y. 2021. A class III bacteriocin with broad-spectrum antibacterial activity from *Lactobacillus acidophilus* NX2-6 and its preservation in milk and cheese. Food Control. 107597.

10.Harrigan, W. 1998. Laboratory methods in food microbiology. Gulf Professional Publishing.

11.Cardinal, M.J., Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R.E. 1997. Isolation of Lactococcus lactis strains producing inhibitory activity against Listeria. Food Biotechnology. 11: 2.129-146.

12.Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. and von Wright, A. (Eds.). 2011. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. Crc Press.

13.Bulut, Ç. 2003. Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese (Master's thesis, İzmir Institute of Technology).

14.Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A. and García, H.S. 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. International journal of food microbiology. 173 .30-35.

16.Kumar, P., Mishra, S., Kumar, A. and Sharma, A.K. 2016. Antifungal efficacy of plant essential oils against stored grain fungi of *Fusarium* sp. Journal of Food Science and Technology. 53. 3725-3734.

17.Mousavi, S.H. and Kafili, T. 2020. Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Raw Milk Taleshi Cheese. Journal of Innovation in Food Science and Technology. 11: 4. 103-114.

18.Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. and McSweeney, P.L. 2017. Microbiology of cheese ripening. In Fundamentals of cheese science. Springer, Boston, MA. 333-390.

19.Tabatabaei, M. and Pourmazaheri, H. 2012. Metagenomics and its application in identification of genetic diversity of microbial ecosystems. Modern genetic Journal. 7: 4. 313-324.

20.Andrighetto, C., Knijff, E.D.O., Lombardi, A., Torriani, S., Vancanneyt, M., Kersters, K., Swings, J. and Dellaglio, F. 2001. Phenotypic and genetic diversity of

enterococci isolated from Italian cheeses. Journal of Dairy Research. 68: 2. 303-316.
21. Hajikhani, R., Darilmaz, D.O., Yuksekdag, Z.N. and Beyatli, Y. 2021. Assessment of some metabolic activities and potential probiotic properties of eight Enterococcus bacteria isolated from white cheese microbiota. Antonie van Leeuwenhoek. 1-16.
23. Donowitz, G.R., and Mandell, G.L. 1988. Beta-lactam antibiotics. New England Journal of Medicine. 318: 7. 419-426.
24. Bahrami, A., and Davati, N. 2021. Analysis of the microbial community in an Iranian local cheese. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 17: 4. 631-645.
25. Dubikova, K., Pristaš, P. and Javorský, P. 2015. Occurrence of abortive infection systems and phage resistance in lactic acid bacteria isolated from bryndza ewes' cheese. Journal of Food & Nutrition Research. 54: 1.
26. Virtanen, T., Pihlanto, A., Akkanen, S. and Korhonen, H. 2007. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. Journal of applied microbiology. 102: 1. 106-115.
27. Gupta, A., Mann, B., Kumar, R. and Sangwan, R.B. 2009. Antioxidant activity of Cheddar cheeses at different stages of ripening. International Journal of Dairy Technology. 62: 3. 339-347.