فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال هشتم، شماره اول، بهار ۱۳۹۹

مقاله پژوهشی

بررسی الگوهای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دو باکتری دارای پتانسیل پروبیوتیکی، *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 جدا شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

فائزه مرتضائی[۱]، مریم رویان[۲]*، مسلم پورابراهیم[۳]، آریا باباخانی[۴]

تاریخ دریافت: اسفند ۹۷ تاریخ پذیرش: تیر ۹۸

چکیده

هدف این پژوهش بررسی الگوهای فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی دو باکتری اسید لاکتیک *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (NABRII64 و NABRII66) دارای پتانسیل پروبیوتیکی جداسازی شده از روده ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بود. الگوی حساسیت فنوتیپی سویه‌های مورد بررسی بر اساس حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک رایج در پزشکی و دامپزشکی شامل آمپی‌سیلین، کانامایسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل بررسی شد. پس از مقایسه مقادیر MIC با مقادیر استاندارد توصیه شده توسط سازمان ایمنی مواد غذایی اتحادیه اروپا (EFSA)، ماهیت مقاومت فنوتیپی مشاهده شده در سویه‌های باکتریایی به وسیله DNA پلاسمیدی از طریق واکنش زنجیره پلی‌مرازی (PCR) بررسی شد. نتایج ارزیابی فنوتیپی نشان دهنده مقاومت تتراسایکلینی در هر دو سویه باکتریایی بود (MIC>۴mg/L). بررسی ژنوتیپی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی شامل *tet* (S)، *tet* (L)، *tet* (M)، *tet* (O)، *tet* (W) و *tet* (K) بیانگر حضور ژن‌های مقاومت *tet* (S) و *tet* (M) در DNA پلاسمیدی هر دو سویه باکتریایی بود. این نتایج، مقاومت اکتسابی و حضور دو ژن مقاومت تتراسایکلینی در DNA پلاسمیدی را در دو سویه باکتریایی NABRII64 و NABRII66 نشان داد. با این حال، مطالعات بیشتری به منظور درک ماهیت مکانیسم مقاومت اکتسابی در آینده مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: *قزل‌آلای رنگین‌کمان، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت تتراسایکلینی، DNA پلاسمیدی،* Lactococcus lactis

۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
۲- استادیار منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۳- کارشناس آزمایشگاه بخش ژنومیکس، منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران.
۴- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران.
* نویسنده مسئول: m.royan@abrii.ac.ir

مقدمه

امروزه با توجه به تغییر اقلیم، خطر بروز و گسترش بیماری‌ها رو به فزونی بوده، نیاز به روش‌های درمانی موثر در این زمینه افزایش یافته است (Tirado et al., 2010). آنتی‌بیوتیک‌ها مهم‌ترین عوامل کنترل کننده و درمان کننده بیماری‌ها هستند. امروزه، ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی مسئله پر اهمیتی است و در تمامی نقاط دنیا یکی از مهم‌ترین بحران‌های تهدید کننده سلامت بشر تلقی می‌شود (Chopra and Roberts, 2001).

آب نه تنها مسیری برای انتشار ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در میان انسان و جانوران است بلکه مسیری برای صدور ژن‌های مقاومت آنتی بیوتیکی به اکوسیستم‌های باکتریایی است. مطالعات نشان داده‌اند بیش از ۹۰ درصد گونه‌های باکتریایی آب‌های شور به بیش از یک آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند. بیش از ۲۰ درصد از این گونه‌ها حداقل به پنج نوع آنتی‌بیوتیک مختلف، مقاوم هستند (Martinez, 2003). عوامل باکتریایی انسانی و غیر انسانی، از طریق پساب‌ها در محیط‌های آبی رهاسازی می‌شوند. بسیاری از این ارگانیسم‌ها حامل ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند که غالبا در پلاسمیدها، ترنسپوزون‌ها و انتگرون‌ها بیان می‌شوند و در بین جوامع باکتریایی خاک و آب انتشار می‌یابند (Alonso et al., 2001). بسیاری از این ژن‌ها، عامل اولیه مقاومت نیستند، بلکه به یک رزیستوم (Resistome) پنهان تعلق دارند. این اصطلاح به مجموعه‌ای از ژن‌ها با قابلیت تبدیل شدن به ژن‌های مقاومت، اطلاق می‌شود (D'costa et al., 2006).

مواد غذایی مصرف نشده و مواد دفعی ماهیان در برگیرنده آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی است. این اجزا به تدریج به رسوبات کف منتقل می‌شوند و پس از تجزیه و انتشار به داخل رسوبات، توسط جریان آب شسته می‌شوند و به مکان‌های دیگر راه می‌یابند (Sorum, 2006). بقایای آنتی‌بیوتیکی باقی‌مانده در رسوبات، سبب بروز فشار انتخابی و منجر به تغییر اجزای تشکیل‌دهنده فلور میکروبی موجود در رسوبات و انتخاب باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک خواهند شد (Beaber et al., 2004; Kim et al., 2004).

انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به عوامل باکتریایی بیماری‌زای انسانی یا جانوری، با استفاده از محصولات حاوی سویه‌های مقاوم در ارتباط است. انتقال ژن مقاومت از یک میکروارگانیسم زنده به سایر میکروارگانیسم‌ها

در محیط‌هایی مانند دستگاه گوارش رخ می‌دهد (Devirgiliis et al., 2011).

باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌هایی گرم مثبت، فاقد اسپور و دارای ریخت‌شناسی متنوعی هستند که از منابع مختلفی جداسازی می‌شوند و دستگاه گوارش یکی از جایگاه‌های اصلی استقرار این میکروارگانیسم‌های باکتریایی است (Asfie et al., 2003). این جدایه‌های باکتریایی با تولید ترکیباتی مانند اسیدهای آلی و پپتیدهای ضدمیکروبی از رشد عوامل بیماری‌زای مختلف ممانعت می‌کنند و به همین دلیل از این ارگانیسم‌های باکتریایی سودمند تحت عنوان «پروبیوتیک» در صنایع مختلف استفاده می‌شود (De Vuyst and Leroy, 2007). از میان جنس‌های متنوع این دسته از باکتری‌های سودمند، برخی ازگونه‌های باکتریایی کوکسی‌شکل متعلق به جنس *Lactococcus* دارای توان بالقوه‌ای در بروز ویژگی‌های پروبیوتیکی هستند. توانایی رشد در شرایط مختلف محیطی و فیزیولوژیکی موجودات زنده، تولید متابولیت‌های ثانویه در مواجهه با عوامل بیماری‌زای مختلف آبزی و خشکی‌زی و ویژگی‌های عملکردی مناسب دیگر از جمله خصوصیت‌های منحصر به فرد زیرگونه‌های مفید مختلف این دسته از باکتری‌های اسید لاکتیک است (Cai et al., 1999; Lyons et al., 2017; Nguyen et al., 2017).

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌هایی که در فرآیند غربال و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک اهمیت دارد، بررسی‌های ایمنی زیستی است. ایمنی زیستی بر طبق پروتکل‌های ارائه شده شامل ارزیابی ویژگی‌هایی مانند حساسیت آنتی‌بیوتیکی، شناسایی حاملین مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولید آمین‌های بیوژنیک و بررسی فعالیت همولیتیک سویه‌های باکتریایی است (FAO/WHO, 2006). از این بین، حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری رایج مورد استفاده در پزشکی و دامپزشکی، بر اساس پروتکل سازمان ایمنی مواد غذایی اتحادیه اروپا (EFSA) از جمله مهم‌ترین عوامل تعیین کننده ایمنی زیستی یک محصول پروبیوتیک تلقی می‌شود (EFSA, 2012).

زمانی که مقاومت به یک عامل بازدارنده آنتی‌بیوتیکی در تمامی سویه‌های یک گونه مشاهده شود عموما با مقاومت ذاتی (Intrinsic Resistance) یا طبیعی در ارتباط است. در مقابل، زمانی که یک سویه حساس به یک عامل ضدمیکروبی، دچار مقاومت شود، مقاومت از نوع اکتسابی (Acquired) خواهد بود (Van

Reenen and Dicks, 2011). مقاومت اکتسابی می‌تواند در پی افزوده شدن ژن‌ها (ژن‌های کسب شده توسط باکتری از طریق کسب DNA خارجی) یا جهش ژن‌های داخلی اتفاق بیافتد (Devirgiliis et al., 2011; Van Reenen and Dicks, 2011).

تمامی محصولات پروبیوتیکی حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک مانند برخی از سویه‌های جنس *Lactococcus* باید از نقطه نظر حساسیت به عوامل ضدمیکروبی مانند آمپی‌سیلین، ونکومایسین، جنتامایسین، کانامایسین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلیندامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل که اهمیت بالایی در پزشکی و دامپزشکی دارند، ارزیابی شوند (EFSA, 2012). ضروری است که تمامی این آزمایش‌ها بر مبنای روش‌های قابل اتکا و و بر اساس استانداردهای بین المللی انجام شود. از جمله روش‌های پایه و ضروری در این گونه ارزیابی‌ها، بررسی حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) است که به منظور ارزیابی حساسیت یا مقاومت اکثر عوامل ضدمیکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مهم استفاده می‌شود. بر این اساس، مقاومت بالای یک سویه باکتریایی به عوامل ضدمیکروبی اختصاصی نسبت به سایر سویه‌های هم‌رده خود از نظر تاکسونومی، می‌تواند بیانگر حضور مقاومت اکتسابی باشد و نیازمند مطالعات بیشتری از نظر ماهیت ژنتیکی است (EFSA, 2012).

بر اساس شیوه‌نامه ارائه شده FEEDAP (۲۰۰۸) هر سویه باکتریایی که حامل مقاومت ذاتی به عوامل ضدمیکروبی است پتانسیل اندکی در انتقال افقی این عوامل دارد و به منظور استفاده در افزودنی‌های غذایی ایمن تلقی می‌شود. هر سویه باکتریایی که حامل مقاومت اکتسابی به عوامل ضدمیکروبی با واسطه عوامل ژنتیکی باشد، بیشترین پتانسیل را در انتقال افقی ژن‌های مقاومت داشته، صلاحیت مصرف به عنوان افزودنی غذایی را ندارد. در صورت عدم وجود اطلاعات دقیق و کافی در رابطه با ماهیت ژنتیکی مقاومت مشاهده شده، نمی‌توان آن را در مراحل بعدی مورد مصرف قرار داد.

از این رو، در مطالعه حاضر ابتدا به بررسی کمی الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط روش MIC در دو سویه باکتریایی اسید لاکتیک متعلق به زیرگونه *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) که

در مطالعه پیشین از نظر وجود ویژگی‌های پروبیوتیکی بررسی شده بودند (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷)، پرداخته شد و سپس ماهیت مقاومت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های باکتریایی از طریق بررسی الگوی مقاومت ژنوتیپی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی

دو سویه باکتریایی اسید لاکتیک با نام‌های *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 در مطالعه پیشین از روده ماهیان سالم قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) متعلق به مزارع پرورشی واقع در غرب استان گیلان جداسازی و ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها در شرایط in vitro بررسی شدند (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷) که این ویژگی‌ها به طور خلاصه در جدول ۱ آمده است.

تمامی آزمایش‌های مربوط به غربال و تعیین ویژگی‌های پروبیوتیکی و ایمنی زیستی این سویه‌های باکتریایی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی جانوری پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، منطقه شمال کشور (رشت) انجام شد.

جدول ۱: ویژگی‌های بیوشیمیایی و پروبیوتیکی دو سویه باکتریایی *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 جدا شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (مرتضائی و همکاران، ۱۳۹۷)

نام سویه‌های باکتریایی	NABRII64	NABRII66
کد دسترسی در NCBI	MH620380	MH620382
رنگ‌آمیزی گرم	مثبت	مثبت
تولید کاتالاز	منفی	منفی
مقاومت به شرایط اسیدی	pH: ۳-۴	pH: ۳-۴
مقاومت به املاح صفراوی	عصاره صفرای ماهی (۱۰٪)	عصاره صفرای ماهی (۱۰٪)
ویژگی ضدمیکروبی	مهار عامل بیماری‌زای *Streptococcus iniae*	مهار عامل بیماری‌زای *Streptococcus iniae*
فعالیت بتا- همولیتیک	ندارد	ندارد

ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر اساس حداقل غلظت بازدارندگی

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) دو سویه باکتریاییNABRII64 و NABRII66 نسبت به هشت آنتی‌بیوتیک تجاری رایج در پزشکی و دامپزشکی شامل آمپی‌سیلین، کلیندامایسین، جنتامایسین، استرپتومایسین، تتراسایکلین، اریترومایسین، کانامایسین و کلرامفنیکل توسط روش Broth Microdilution بررسی شد (Klare et al., 2005). بدین منظور، از تمامی استوک‌های آنتی‌بیوتیک در محیط کشت LAB Susceptibility Test Medium (LSM) حاوی MRS Broth (Merck، آلمان) و Iso-Sensitest (Oxoid، بریتانیا)، رقت‌های ۰/۲۵-۱۲۸ μg/mL تهیه شد. از سوسپانسیون‌های باکتریایی منتخب، کدورتی با OD_{630} ۰/۲ تهیه و به رقت‌های آنتی‌بیوتیکی موجود در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای در دمای ۲۵°C به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. سپس میزان رشد سویه‌ها در رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک‌های تجاری مشاهده و توسط دستگاه الایزا ریدر (ELX808، BioTek، آمریکا) ثبت شد. در نهایت، مقادیر MIC در هر سویه باکتریایی با استاندارد بیان شده در EFSA مقایسه شد (EFSA, 2012). سویه‌هایی که غلظتی بالاتر از استاندارد ارائه شده نشان دادند، مقاوم شناخته شدند.

ارزیابی الگوی ژنوتیپی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جداسازی DNA پلاسمیدی

جداسازی DNA پلاسمیدی توسط روش لیز قلیایی (Alkaline Lysis) انجام شد (Feliciello and Chinali, 1993). به طور خلاصه، ابتدا سویه‌های مورد نظر با تلقیح در محیط کشت MRS Broth در دمای ۲۵°C مورد کشت یک شبه قرار داده شدند و از هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌ها با دور ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ (2-16P، Sigma، آلمان) شدند. پس از حذف فاز شناور رویی، از پلت سلولی به همراه ۱mL محلول بافر اول دارای گلوکز ۵۰mM، ۱۰mM EDTA و محلول تریس ۲۵mM سوسپانسیونی تهیه شد. سپس ۲mL محلول دوم شامل ۰/۲N NaOH و SDS و ۱/۵mL محلول سوم شامل ۱/۵mL ۳M KOAc به سوسپانسیون ابتدایی اضافه و با دور ۱۵۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز شناور رویی به تیوب دیگر منتقل شد و به منظور رسوب DNA پلاسمیدی، به آن

ایزوپروپانول اضافه شد. رسوب DNA پلاسمیدی با سانتریفیوژ نهایی تیوب در انتهای آن نمایان شد. پس از رقیق‌سازی، DNA پلاسمیدی برای بررسی‌های دیگر در دمای ۴°C نگهداری شد.

واکنش زنجیره پلیمرازی و بررسی وجود ژن‌های پلاسمیدی توسط الکتروفورز

به منظور بررسی ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک در DNA پلاسمیدی استخراج شده از هر سویه باکتریایی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) درحجم ۱۵ μL انجام شد. محلول مسترمیکس PCR شامل محلول بافر ۱۰X، dNTP، Taq DNA Polymerase، $MgCl_2$ (سیناژن، ایران)، آب و آغازگرهای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک (جدول ۲) به همراه ۲μL از DNA پلاسمیدی بود و از مسترمیکس بدون DNA پلاسمیدی به عنوان شاهد منفی استفاده شد. این واکنش شامل واسرشته‌سازی اولیه تحت دمای ۹۶°C به مدت ۵ دقیقه در یک سیکل، واسرشته‌سازی اصلی تحت دمای ۹۶°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای اختصاصی هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه (جدول ۲) در ۳۲ سیکل، گسترش تحت دمای ۷۲°C به مدت زمان ۴۵ ثانیه و گسترش نهایی تحت دمای ۷۲°C به مدت زمان یک دقیقه در یک سیکل بود که توسط دستگاه Thermal Cycler (T100، Bio-Rad، آمریکا) انجام شد.

جدول ۲: آغازگرهای ژن مقاومت به تتراسایکلین مورد مطالعه و مشخصات آن‌ها

ژن هدف	توالی آغازگرهای ژن *tet* (5'→3')	دمای اتصال (°C)	طول باند (bp)	منبع
***tet* (S)**	F: TGGAACGCCAGAGAGGTATT R: ACATAGACAAGCCGTTGACC	۵۸	۷۲۰	Aarestrup et al., 2000
***tet* (O)**	F: AATGAAGATTCCGACAATTT R: CTCATGCGTTGTAGTATTCCA	۵۵	۷۸۱	Preethi et al., 2017
***tet* (M)**	F: GTTAAATAGTGTTCTTGGAG R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	۵۸	۶۵۷	Aarestrup et al., 2000
***tet* (L)**	F: CATTTGGTCTTATTGGATCG R: ATTACACTTCCGATTTCGG	۵۵	۴۵۶	Aarestrup et al., 2000
***tet* (K)**	F:TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACTCATTCCAGAAGCA	۵۵	۶۹۷	Aarestrup et al., 2000
***tet* (W)**	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	۵۸	۱۶۸	Aminov et al., 2001

بررسی تشکیل باند محصول PCR توسط بارگذاری نمونه‌ها در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد (Aarestrup et al., 2000).

نتایج

الگوی فنوتیپی حساسیت آنتی‌بیوتیکی

نتایج ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های باکتریایی *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 در جدول ۳ آمده است. بر اساس نتایج MIC و با در نظر گرفتن استانداردهای EFSA، هر دو سویه باکتریایی تنها نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین مقاوم بودند و نسبت به سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی مقاومتی مشاهده نشد.

جدول ۳: الگوی فنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در دو سویه باکتریایی اسید لاکتیک (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66)

آنتی‌بیوتیک‌های تجاری	حداقل غلظت بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌ها (MIC) (mg/L)		استاندارد MIC ارائه شده در EFSA (mg/L)
	NABRII64	NABRII66	
آمپی‌سیلین	<۰/۲۵*	۰/۲۵	>۲
جنتامایسین	۳۲	۸	>۳۲
کانامایسین	۶۴	۱۶	>۶۴
استرپتومایسین	۳۲	۳۲	>۳۲
اریترومایسین	۱	۱	>۱
کلیندامایسین	<۰/۲۵	<۰/۲۵	>۱
تتراسایکلین	۶۴R	۱۲۸R	>۴
کلرامفنیکل	۲	۲	>۸

*: مقدار «<۰/۲۵» بیانگر عدم تشخیص رشد سویه‌های باکتریایی حتی در کمترین رقت مورد نظر از آنتی‌بیوتیک‌های تجاری است.

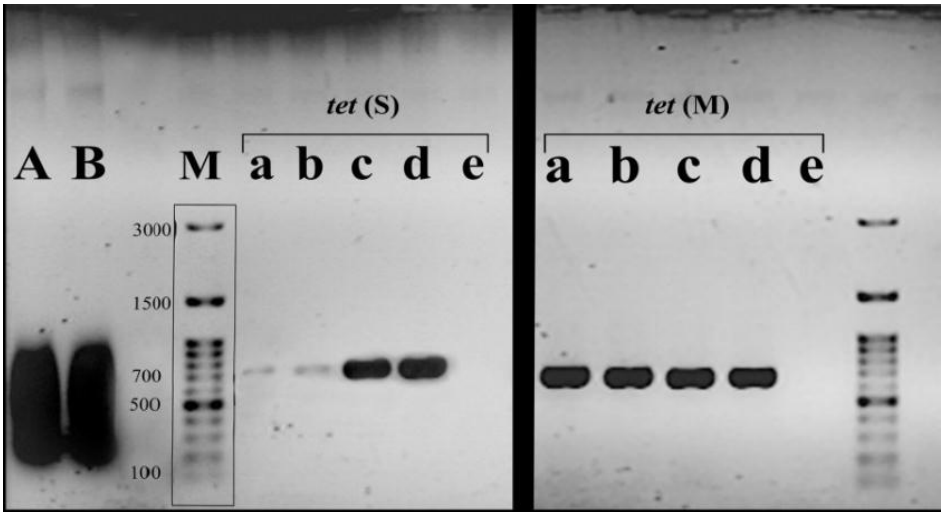
R: مقاومت سویه‌های باکتریایی به آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر بر اساس استاندارد بیان شده توسط EFSA

الگوی ژنوتیپی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از PCR

نتایج ارزیابی محصول PCR دو سویه باکتریایی منتخب پروبیوتیک در شکل ۱ آمده است. بر این اساس، DNA پلاسمیدی هر دو سویه دارای ژن‌های *tet* (S) و *tet* (M) و فاقد ژن‌های *tet* (L)، *tet* (O)، *tet* (W) و *tet* (K) بود.

بحث

درمان‌های شیمیایی مختلفی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، واکسن‌ها و مواد ضدعفونی کننده برای کنترل عوامل بیماری‌زا در آبزی‌پروری استفاده می‌شود. تتراسایکلین از جمله آنتی‌بیوتیک‌های موثر و رایج با سابقه مصرف طولانی در آبزی‌پروری است.



شکل ۱: بررسی الگوی ژنوتیپی مقاومت به آنی‌بیوتیک تتراسایکلین در سویه‌های باکتریایی اسید لاکتیک (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66). تصویر ژل آگارز ۱/۵ درصد ثبت شده توسط ژل‌داک مربوط به DNA پلاسمیدی است. تصویر سمت راست: محصول PCR دو سویه باکتریایی اسید لاکتیک با استفاده از آغازگر *tet* (M). تصویر سمت چپ: محصول PCR دو سویه باکتریایی اسید لاکتیک با استفاده از آغازگر *tet* (S). بر اساس تصویر بالا. A: DNA پلاسمیدی استخراج شده از NABRII64؛ B: DNA پلاسمیدی استخراج شده از NABRII66؛ M: DNA Ladder Plus 100bp؛ a و b: NABRII64 (دو تکرار)؛ c و d: NABRII66 (دو تکرار)؛ e: شاهد منفی.

مشتقات مختلفی از تتراسایکلین در آزادماهیان مصرف می‌شوند (Zhang et al., 2009; Miranda et al., 2018). این آنتی‌بیوتیک به زیرواحد 30S ریبوزومی متصل شده، از اتصال آمینوآسیل-tRNA به جایگاه (پذیرنده) A ریبوزوم که محل ورود اسیدهای آمینه جدید است، جلوگیری می‌کند و مانع سنتز پروتئین می‌شود. بنابراین دارای ویژگی باکتریواستاتیک است (Akinbowale et al., 2007). با این حال، استفاده عمده از آن سبب بروز مقاومت در عوامل بیماری‌زای ماهی شده است (Fajardo and Martinez, 2008). در مطالعه حاضر، حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) سویه‌های باکتریایی *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 در هشت آنتی‌بیوتیک تجاری مختلف با یکدیگر متفاوت بود و مقایسه مقادیر به دست آمده با مقادیر استاندارد MIC ارائه شده توسط EFSA (۲۰۱۲) مقاومت آن‌ها را نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و حساسیت آن‌ها را نسبت به هفت آنتی‌بیوتیک دیگر نشان داد. Ammor و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی مقادیر MIC در ۱۴۳ جدایه باکتریایی اسید لاکتیک شامل سویه‌هایی از *L. lactis* و *Bifidobacteria* جداسازی شده از منابع مختلف، مشاهده کردند که غلظت‌های بازدارندگی جدایه‌های باکتریایی در مواجهه با آنتی‌بیوتیک‌های تجاری با یکدیگر متفاوت بود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشت.

به طور کلی چهار مکانیسم عمده در بروز مقاومت تتراسایکلین نقش دارند که عبارتند از: پمپ‌های افلاکس (Efflux Pumps)، پروتئین‌های محافظ ریبوزومی (Ribosomal Protection Proteins: RPP)، غیرفعال‌سازی آنزیمی و تغییر در سلول هدف که عمده‌ترین مکانیسم‌ها شامل پمپ‌های افلاکس و RPP در میکروارگانیسم‌ها هستند (CLSI, 2005). در مطالعه حاضر، پس از مشاهده نتایج بررسی مقاومت فنوتیپی دو سویه باکتریایی به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین، به بررسی شش ژن مطرح مقاومت به تتراسایکلین در باکتری‌های اسید لاکتیک پرداخته شد که در این میان، ژن‌های *tet* (K) و *tet* (L) کد کننده پمپ‌های افلاکس و *tet* (S)، *tet* (M)، *tet* (O) و *tet* (W) کد کننده RPP بودند (McMurry and Levy, 2000). نتایج ارزیابی PCR در این مطالعه نشان دهنده وجود ژن‌های مقاومت *tet* (M) و *tet* (S) در DNA پلاسمیدی هر دو سویه باکتریایی بود. در میان ژن‌های کد کننده

RPP، *tet* (M) رایج‌ترین و فراوان‌ترین ژن در بین باکتری‌های گرم مثبت و منفی، در محیط‌های آبی است (Roberts, 1996; Petersen and Dalsgaard, 2003).

Petersen و Dalsgaard (۲۰۰۳) مشاهده کردند که تمامی گونه‌های *Enterococcus* spp. جداسازی شده از مزارع ماهیان پرورشی کشت تلفیقی در تایلند، دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تجاری بودند و پس از بررسی الگوی ژنوتیپی مقاومت، ژن‌های *tet* (M) و *erm* (B) به ترتیب به میزان ۹۵ و ۸۷ درصد در بین جدایه‌ها گزارش شدند. Kim و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای با هدف ارزیابی ژن‌های RPP شامل *tet* (M)، *tet* (O)، *tet* (P)، *tet* (S)، *tet* (Q) و *tet* (W) در فلور باکتریایی جداسازی شده از ماهیان دریایی سالم و بیمار، مشاهده کردند که *tet* (M) فراوان‌ترین ژن مقاومت تتراسایکلینی در میان باکتری‌های جداسازی شده از مناطق آبزی‌پروری دریایی و ماهیان سالم بود. *tet* (S) تنها در سویه باکتریایی *Lactococcus garvieae* جداسازی شده از ماهی دم زرد ژاپنی (*Seriola quinqueradiata*) بیمار مشاهده شد. همچنین، این مطالعه اولین گزارش از وجود این ژن‌ها در دستگاه گوارش ماهیان دریایی بود (Kim et al., 2004). در مطالعه دیگری، با هدف بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تتراسایکلین و اکسی‌تتراسایکلین در باکتری‌های جداسازی شده از منابع مختلف آبزی‌پروری مشاهده شد که ۱۹ درصد از جدایه‌های باکتریایی نسبت به اکسی‌تتراسایکلین مقاوم بودند و *tet* (M) عمده‌ترین (۵۰ درصد) عامل انتقال مقاومت بود (Akinbowale et al., 2007).

Ammor و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ژن مقاومت را در سویه‌های *L. lactis* (*tet* (M)) در DNA پلاسمیدی شناسایی کردند که بیانگر وجود مقاومت اکتسابی در سویه‌های باکتریایی بود. Perreten و همکاران (۱۹۹۷) ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین (*tet* (S))، کلرامفنیکل (*cat*) و استرپتومایسین (*str*) که در DNA پلاسمیدی کد می‌شوند را در برخی از سویه‌های *L. lactis* مشاهده و گزارش کردند. Florez و همکاران (۲۰۰۷) پس از بررسی الگوی مقاومت فنوتیپی ۹۳ سویه باکتریایی *L. lactis* جدا شده از اکوسیستم‌های مختلف شامل محیط آبی و خشکی، مقادیر متفاوت غلظت‌های بازدارندگی و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی اکتسابی را در بین ۱۱ سویه باکتریایی *L. lactis* مشاهده

کردند. از این میان، دو سویه باکتریایی جداسازی شده از ماهی به تتراسایکلین و استرپتوماسین مقاوم بودند. همچنین بررسی الگوی ژنوتیپی مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط PCR نشان داد که سویه‌های مقاوم به تتراسایکلین، ناقل ژن‌های مقاومت پلاسمیدی شامل *tet* (M) و *tet* (L/S) بودند (Florez et al., 2007). *tet* (S) همچنین، در ناقلین ژن مقاومت (DNA پلاسمیدی و ترنسپوزون) باکتری‌های گرم مثبت مانند *L. lactis* و *Listeria* sp. گزارش شد (Clewell et al., 1995; Araujo et al., 2015). بنابراین، نتایج مطالعات مختلف نشان دهنده فراوانی دو ژن *tet* (M) و *tet* (S) در منابع آبی مختلف است که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

مقاومت به تتراسایکلین می‌تواند در بین ارگانیسم‌های موجود در مزارع پرورش ماهی گسترش یابد و بدین ترتیب میکروبیوتای طبیعی ماهیان و محیط آبی منبع مهمی از ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک تلقی می‌شوند (Kim et al., 2004). توانایی انتقال محتوای ژنی بین گونه‌های مختلف *Lactococcus* وجود دارد و این ویژگی در زیر گونه‌های *L. lactis* به اثبات رسیده است (Lampkowska et al., 2008). البته، توانایی انتقال ژن مقاومت تتراسایکلین با واسطه پلاسمید از *Lactococcus* به سایر جنس‌های باکتری‌های کوکسی‌شکل گزارش نشده است (Guglielmetti et al., 2009).

نتایج مطالعه حاضر حاکی از وجود مقاومت فنوتیپی تنها به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین و حساسیت به هفت آنتی‌بیوتیک تجاری دیگر در دو سویه باکتریایی منتخب پروبیوتیک شامل *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 و *L. lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 بود. از طرفی پس از ارزیابی ژنوتیپی مشاهده شد که دو ژن *tet* (M) و *tet* (S) در DNA پلاسمیدی کدگذاری شدند. این مسئله بیانگر مقاومت آنتی‌بیوتیکی اکتسابی در سویه‌های باکتریایی مورد بررسی است و بر اساس توصیه EFSA (۲۰۱۲) لازم است سویه‌های مذکور از این نظر مورد ارزیابی‌های دقیق‌تری قرار گیرند تا مشخص شود که مقاومت اکتسابی مشاهده شده در اثر اضافه شدن ژن مذکور از منابعی دیگر به خزانه ژنی باکتری‌های مورد نظر است یا حاصل وقوع جهش ژنومی که در صورت وقوع رخداد دوم می‌توان از باکتری مورد نظر در ترکیب مکمل‌های پروبیوتیکی استفاده کرد. افزایش مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین در جدایه‌های باکتریایی به علت سوء مصرف و عدم

دانش کافی در زمینه استفاده از این آنتی‌بیوتیک در مزارع پرورش آبزیان، به ویژه پرورش ماهیان سردآبی صورت می‌گیرد. ارتقای مدیریت مزارع از نظر بهداشت، تغذیه و استفاده از روش‌های کنترل زیستی موثر در مواجهه با عوامل بیماری‌زا به کاهش بروز مشکلاتی از این دسته کمک شایانی خواهد کرد.

تشکر و قدردانی

تمامی فعالیت‌های پژوهشی این مطالعه در آزمایشگاه بیوتکنولوژی جانوری و ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، مدیریت شمال کشور انجام و بخشی از یک پروژه مصوب با شناسه ۱۲۰۵۰۵۹۴۵۵۹۴۰۰۱ بود. در این راستا، از کلیه متخصصین و اعضای هیئت علمی این پژوهشکده به پاس راهنمایی‌های ارزنده، سپاس‌گزاری می‌گردد.

منابع

مرتضائی ف.، رویان م.، علاف نویریان ح. و باباخانی آ. ۱۳۹۷. بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی شده از روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) علیه باکتری *Streptococcus iniae*. مجله علوم آبزی‌پروری، ۶(۳): ۵۴-۴۳.

Aarestrup F.M., Agerso Y., Gerner-Smidt P., Madsen M. and Jensen L.B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 37: 127–37.

Akinbowale O.L., Peng H. and Barton M.D. 2007. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. Journal of Applied Microbiology, 103: 2016 –2025.

Alonso A., Sanchez P. and Martinez J.L. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. Environmental Microbiology, 3: 1–9.

Aminov R.I., Garrigues-Jeanjean N. and Mackie R.I. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Applied and Environmental Microbiology, 67: 22–32.

Ammor M.S., Florez A.B., Van Hoek A.H., Clara G., Aarts H.J., Margolles A. and Mayo B. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 14: 6–15.

Araujo C., Munoz-Atienza E., Ramirez M., Poeta P., Igrejas G., Hernandez P.E., Herranz C. and Cintas L.M. 2015. Safety assessment, genetic relatedness and bacteriocin activity of potential probiotic *Lactococcus lactis* strains from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and rearing environment. European Food Research and Technology, 241: 647–662.

Asfie M., Yoshijima T. and Sugita H. 2003. Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. Fisheries Research, 69: 21–26.

Beaber J.W., Hochhut B. and Waldor M.K. 2004. SOS response

promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature, 427: 72–74.

Cai Y., Suyanandana P., Saman P. and Benno Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General and Applied Microbiology, 45: 177–184.

Chopra I. and Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 65: 232–260.

Clewell D.B., Flannagan S.E. and Jaworski D.D. 1995. Unconstrained bacterial promiscuity: The Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. Trends in Microbiology, 3: 229–236.

CLSI 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement, CLSI/NCCLS M100-S15. CLSI, Wayne, Pa, from https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100.

D'costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W. and Wright G.D. 2006. Sampling the antibiotic resistome. Science, 311: 374–377.

De Vuyst L. and Leroy F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13: 194–199.

Devirgiliis C., Barile S. and Perozzi G. 2011. Antibiotic resistance determinants in the interplay between food and gut microbiota. Genes and Nutrition, 6: 275–284.

EFSA 2012. Panel on additives and products or substances used in animal feed, guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal, 10: 1–10.

FEEDAP. 2008. EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed technical guidance on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. EFSA Journal, 732: 1–15.

Fajardo A. and Martinez J.L. 2008. Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. Current Opinion in Microbiology, 11: 161–167.

FAO/WHO 2006. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, in FAO Food and Nutrition Paper, Italy. 56P.

Feliciello I. and Chinali G. 1993. A modified alkaline lysis method for the preparation of highly purified plasmid DNA from *Escherichia*

coli. Analytical Biochemistry, 212: 394–401.

Florez A.B., Danielsen M., Korhonen J., Zycka J., Von Wright A., Bardowski J. and Mayo B. 2007. Antibiotic survey of *Lactococcus lactis* strains to six antibiotics by Etest, and establishment of new susceptibility-resistance cut-off values. Journal of Dairy Research, 74: 262–268.

Guglielmetti E., Korhonen J.M. Heikkinen J., Morelli L. and Von Wright A. 2009. Transfer of plasmid-mediated resistance to tetracycline in pathogenic bacteria from fish and aquaculture environments. FEMS Microbiology Letters, 293: 28–34.

Kim S.R., Nonaka L. and Suzuki S. 2004. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet* (M) and *tet* (S) in bacteria from marine aquaculture sites. FEMS Microbiology Letters, 237: 147–156.

Klare I., Konstabel C., Muller-Bertling S., Reissbrodt R., Huys G., Vancanneyt M., Swings J., Goossens H. and Witte W. 2005. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of Lactobacilli, Pediococci, Lactococci, and Bifidobacteria. Applied Environmental Microbiology, 71: 8982–8986.

Lampkowska J., Feld L., Monaghan A., Toomey N., Schjorring S., Jacobsen B., Van Der Voet H., Andersen S.R., Bolton D., Aarts H. and Krogfelt K.A. 2008. A standardized conjugation protocol to asses antibiotic resistance transfer between lactococcal species. International Journal of Food Microbiology, 127: 172–175.

Lyons P.P., Turnbull J.F., Dawson K.A. and Crumlish M. 2017. Exploring the microbial diversity of the distal lumen and mucosa of farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) using next generation sequencing (NGS). Aquaculture Research, 48: 77–91.

Martinez J.L. 2003. Recent advances on antibiotic resistance genes. Recent Advances in Marine Biotechnology, 10: 13–32.

McMurry L.M. and Levy S.B. 2000. Tetracycline resistance in gram positive bacteria. P: 660–677. In: Fischetti V.A., Novick R.P., Ferretti J.J. Portnoy D.A. and Rood J.I. (Eds.). Gram-positive Pathogens. American Society for Microbiology, USA.

Miranda C.D., Godoy F.A. and Lee M. 2018. Current status of the use of antibiotics and their antimicrobial resistance in the Chilean salmon farms. Frontiers in Microbiology, 9: 1284, from https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01284.

Nguyen T.L., Park C.I. and Kim D.H. 2017. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. Aquaculture, 471: 113–120.

Perreten V., Schwarz F., Cresta L., Boeglin M., Dasen G. and Teuber M. 1997. Antibiotic resistance spread in food. Nature, 389: 801–802.

Petersen A. and Dalsgaard A. 2003. Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. Environmental Microbiology, 5: 395–402.

Preethi C., Thumu S.C.R. and Halami P.M. 2017. Occurrence and distribution of multiple antibiotic-resistant *Enterococcus* and *Lactobacillus* spp. from Indian poultry: In vivo transferability of their erythromycin, tetracycline and vancomycin resistance. Annals of Microbiology, 67: 395–404.

Roberts M.C. 1996. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. FEMS Microbiology Reviews, 19: 1–24.

Sorum H. 2006. Antimicrobial drug resistance in fish pathogens. P: 213–238. In: Aarestrup F.M. (Ed.). Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. American Society for Microbiology Press, USA.

Tirado M.C., Clarke R., Jaykus L.A., McQuatters-Gollop A. and Frank J.M. 2010. Climate change and food safety: A review. Food Research International, 43: 1745–1765.

Van Reenen C.A. and Dicks L.M. 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: What are the possibilities? A review. Archives of Microbiology, 193: 157–168.

Zhang X.X., Zhang T. and Fang H.H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. Applied Microbiology and Biotechnology, 82: 397–414.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 8, No. 1, Spring 2020

Research Paper

Assessment of antibiotic resistance patterns in two potential probiotic bacteria, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII64 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* NABRII66 isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine

Faezeh Mortezaei[1], Maryam Royan[2]*, Moslem Pourebrahim[3], Aria Babakhani[4]

Received: March 2019 Accepted: July 2019

Abstract

This study aimed to investigate the phenotypic and genotypic patterns of antibiotic resistance in two potential probiotic lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (NABRII64 and NABRII66) isolated from the rainbow trout intestine. The phenotypic susceptibility pattern of the strains was studied based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of eight most commonly used antibiotics in medicine and veterinary including ampicillin, kanamycin, gentamicin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and chloramphenicol. After comparing the MICs with standard values recommended by European Food Safety Authority (EFSA), the nature of the phenotypic resistance observed in bacterial strains was investigated by polymerase chain reaction (PCR) through plasmid DNA extraction. The results of phenotypic evaluation indicated the tetracycline resistance in both bacterial strains (MIC>4mg/L). Genotyping of antibiotic resistance genes including *tet* (S), *tet* (L), *tet* (M), *tet* (O), *tet* (W) and *tet* (K) indicated the presence of *tet* (S) and *tet* (M) resistance genes in plasmid DNA of both bacterial strains. These results exhibited the acquired resistance and the presence of two tetracycline resistance genes in the plasmid DNA of two bacterial strains, NABRII64 and NABRII66. However, further studies are required to understand the nature of the acquired resistance mechanism in the future.

Key words: *Rainbow Trout, Antibiotic Resistance, Tetracycline Resistance, Plasmid DNA*, Lactococcus lactis.

1- M.Sc. in Aquaculture, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.
2- Assistant Professor in North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
3- Technician in Genomics Department, North Region Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran.
4- Assistant Professor in Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran.

*Corresponding Author: m.royan@abrii.ac.ir