Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Tetracycline resistance in Lactobacilli isolated from digestive system of Iranian backyard chickens

Maryam Royan

*Corresponding author. Assistant Professor, Animal Biotechnology Research Institute, Agricultral Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. E-mail address: m.royan@abrii.ac.ir

Ramin Seighalani

Ph.D. in Agricultral Biotechnology, Animal Biotechnology Research Institute, Agricultral Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. E-mail address: raminseighalani@abrii.ac.ir

Payam Potki

Master of Animal Genetics and Breeding, Agricultral Biotechnology, Animal Biotechnology Research Institute, Agricultral Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran. E-mail address: p.potki@abrii.ac.ir

Abstract

Objective

Identifying the strains carrying acquired tetracycline resistance genes is one of the important points in evaluating the safety of probiotic strains. The aim of the present study is to comprehensively evaluate tetracycline resistance in *lactobacillus* spp. isolated from the digestive system of Iranian backyard chickens.

Materials and methods

In the present study, the phenotypic sensitivity patterns of 36 *lactobacillus* isolates belonging to four species *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. crispatus* and *L. johnsonii* were evaluated by measuring the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to tetracycline. After that, four tetracycline resistance genes tet(L), tet(M), tet(W) and tet(O) were detected in isolates with phenotypic resistance to this antibiotic based on the polymerase chain reaction method.

Results

As a result, four isolates of *L. reuteri*, three isolates of *L.salivarius*, two isolates of *L. crispatus* and four isolates of *L. johnsonii* among the studied *lactobacillus* spp. showed phenotypic resistance to tetracycline. After the detection of tetracycline resistance genes in isolates with phenotypic resistance, the presence of tet(W) gene was confirmed in all investigated isolates. The simultaneous presence of tet(M), tet(L) and tet(W) genes was observed in three studied *L. salivarius* isolates. It was also found that the phenotypic resistance observed in three isolates of *L. johnsonii*ABRIG7, *L. johnsonii*ABRIG14 and *L. johnsonii*ABRIG24 is caused by the simultaneous presence of tet(O) and tet(W) genes.

Conclusions

This study showed that tetracycline resistance among *Lactobacilli* isolated from digestive system of Iranian backyard Chickens is due to the presence of single or multiple resistance genes.. We also found that tet(W) is the most widespread tetracycline resistance gene among investigated *Lactobacillus* isolates. Therefore, local poultry breeders should refrain from arbitrarily using tetracycline, and when the digestive system of domestic chickens is the source for probiotic microorganism selection, the evaluation of resistance to tetracycline from the phenotypic and molecular point of view should be taken into consideration in order to select safe strains.

Keywords: Antibiotic resistance, backyard chicken, Tetracycline, *Lactobacillus*, Probiotics

Paper Type: Research Paper.

Citation: Royan M, Seighalani R, Potki P (2024) Tetracycline resistance in Lactobacilli isolated from digestive system of Iranian backyard chickens. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (2), 51-68.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (2), 51-68. DOI: 10.22103/jab.2024.22126.1509

Received: January 16, 2024. Received in revised form: March 17, 2024.

Accepted: March 18, 2024. Published online: May 31, 2024.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

مقاومت تتراسایکلین در لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران

مریم رویان

*نویسنده مسئول: استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران. رایانامه: m.royan@abrii.ac.ir

رامین صیقلانی

دکتری بیوتکنولوژی ک شاورزی، پژوه شکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوه شگاه بیوتکنولوژی ک شاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران. رایانامه: raminseighalani@abrii.ac.ir

پیام پتکی

کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران. رایانامه: p.potki@abrii.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۲۶ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۱۲/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۸

چکیده

هدف: شناسایی سویه‌های حامل ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین از جمله نکات حائز اهمیت در ارزیابی ایمنی سویه‌های دارای پتانسیل پروبیوتیک است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی جامع مقاومت تتراسایکلینی در میان گونه های *لاکتوباسیلوسی* جداسازی شده از دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر ابتدا الگوهای حساسیت فنوتیپی ۳۶ جدایه *لاکتوباسیلوسی* متعلق به چهار گونه *L.reuteri*، *L. salivarius*، *L. crispatus* و *L. johnsonii* با اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی نسبت به تتراسایکلین ارزیابی گردید. پس از آن چهار ژن مقاومت به تتراسایکلین tet(L)، tet(M)، tet(W) و tet(O) در جدایه‌های دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به این آنتی بیوتیک با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ردیابی گردیدند.

نتایج: در نتیجه تست فنوتیپی بر مبنای حداقل غلظت بازدارندگی چهار جدایه *L.reuteri*، سه جدایه *L. salivarius*، دو جدایه *L. crispatus* و چهار جدایه *L. johnsonii* از میان جدایه‌های مورد مطالعه مقاومت فنوتیپی نسبت به تتراسایکلین نشان دادند. پس

از ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین درجدایه‌های دارای مقاومت فنوتیپی حضور ژن tet(W) درتمامی جدایه‌های مورد بررسی تائید گردید. حضور همزمان ژن‌های tet(M)، tet(L) و tet(W) در سه جدایه *L. salivarius* مورد مطالعه مشاهده گردید. علاوه بر آن مشخص گردید، مقاومت فنوتیپی مشاهده شده در سه جدایه*L. johnsonii*ABRIG7 ،*L. johnsonii*ABRIG14 و *L. johnsonii*ABRIG24 ناشی از حضور همزمان ژن‌های tet(O) و tet(W) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که مقاومت تتراسایکین موجود در میان جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* بدست آمده از دستگاه گوارش طیور بومی ایران ناشی از حضور منفرد یا چندگانه ژن‌های مقاومت نسبت به این آنتی‌بیوتیک می‌باشد. همچنین دریافتیم که tet(W) گسترده‌ترین ژن مقاومت به تتراسایکلین در میان جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی می‌باشد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر پرورش دهندگان طیور بومی باید از استفاده خودسرانه تتراسایکلین خودداری نمایند و زمانیکه دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی منبعی برای انتخاب میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک است، لازم است ارزیابی مقاومت نسبت به تتراسایکلین از منظر فنوتیپی و ملکولی جهت انتخاب سویه‌های ایمن مورد توجه قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: ، پروبیوتیک، تتراسایکلین، *لاکتوباسیلوس*، مقاومت آنتی‌بیوتیک، مرغ‌های خانگی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رویان مریم، صیقلانی رامین، پتکی پیام (۱۴۰۳) مقاومت تتراسایکلین در لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۲)، ۵۱-۶۸.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

پرورش طیور در ایران و توزیع آن در این کشور سابقه بسیار قدیمی داشته و بر اساس کاوش‌های باستان شناسی به دوران باستان برمی‌گردد (Mohammadabadi et al. 2010). بر اساس تحقیقات انجام شده، جنوب شرقی ایران حدود ۳۸۰۰ تا ۳۹۰۰ سال قبل از میلاد و شمال غربی ایران حدود ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد بر اساس استخوان‌های یافت شده منشاء پرورش مرغ بوده اند (Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar and Mohammadabadi 2017). اهمیت مرغ بدلیل تامین پروتئین با کیفیت بالا (تولید گوشت و تخم مرغ) برای انسان و همچنین کاربرد آن به عنوان حیوان نمونه در مطالعات ژنومی می‌باشد (Shahdadnejad et al. 2016; Khabiri et al. 2023). هر ساله میلیاردها جوجه برای تامین نیاز پروتئینی مصرف‌کنندگان پرورش می‌یابد (Mohammadifar and Mohammadabadi 2018). سال‌ها به‌منظور رونق این صنعت عظیم و پیشگیری

از ضرر و زیان اقتصادی استفاده از آنتی بیوتیک‌های محرک رشد به روشی مطلوب و پرکاربرد در این صنعت تبدیل شده بود. اما، امروزه مقاومت آنتی‌بیوتیکی به یکی از بزرگترین تهدیدها برای سلامت جهانی، امنیت غذایی و توسعه تبدیل شده‌است که سلامت افراد، حیوانات، گیاهان ومحیط زیست را تحت شعاع قرار داده است (CDC 2022; WHO 2020). از میان بسیاری از عوامل مسئول ظهور و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، استفاده غیر درمانی از مواد ضد میکروبی در خوراک حیوانات از جمله مهمترین عوامل تاثیر گذار است (Rokon et al. 2023). از این‌رو با توجه به عواقب خطرآفرین ناشی از وقوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد با ترکیبات مناسب دیگر نظیر پروبیوتیک‌ها در دستورکار قرار گرفت.

از میان انواع میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک گونه‌های *لاکتوباسیلوسی* به دلیل خواص ارتقاء دهنده سلامتی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند و علاقه به استفاده از این باکتری‌های محبوب همچنان در حال رشد است. *لاکتوباسیلوس‌ها* بلافاصله پس از تولد در دستگاه گوارش جوجه‌ها مستقر می‌شوند و فعالیت متابولیکی آن‌ها، pH دستگاه گوارش را کاهش می‌دهد و از رشد انتروباکتری‌ها و سایر باکتری‌های نامطلوب جلوگیری می‌کند (Zhao et al. 2007; Felis and Dellaglio 2007). به چندین گونه از باکتری‌های اسیدلاکتیکی وضعیت QPS[1] (پیش فرض واجد شرایط ایمنی) داده شده‌است (Leuschner et al. 2010). با این حال، در سال‌های اخیر، به دلیل استفاده نادرست از آنتی‌بیوتیک‌ها (استفاده بیش از حد و سوء استفاده)،دربسیاری از باکتری‌های اسید لاکتیکی مقاومت دارویی ایجاد شده‌است (Shazali et al. 2014). مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های جداسازی شده از مواد غذایی یا دستگاه گوارش حیوانات مزرعه حاوی انواع ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی است که روی عناصر ژنتیکی متحرک قرار داشته و خطر بالقوه انتقال افقی ژن را بر عهده دارند (Rokon et al. 2023). هنگامی که این سویه‌ها همراه با غذا وارد دستگاه می‌شوند، ممکن است ژن‌های مقاومت خود را از طریق زنجیره غذایی به باکتری‌های بیماری‌زای فرصت طلب روده منتقل کنند و منجر به انتقال مقاومت دارویی به میزبان گردند. برخی مطالعات تایید کرده‌اند که ژن مقاومت به تتراسایکلین در باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند از طریق سیستم انتقال افقی ژن به باکتری‌های دیگر منتقل شود (Das et al. 2020). از این‌رو سازمان غذا و کشاورزی (FAO[2]) و سازمان بهداشت جهانی (WHO[3]) در سال ۲۰۰۲ پیشنهاد نمودند پروبیوتیک‌هایی که به عنوان فرآورده‌های غذایی و خوراکی مصرف می‌شوند باید از نظر مقاومت آنتی‌بیوتیکی ارزیابی گردند (Hill et al. 2014). لذا، بر اساس توصیه EFSA[4] برای تشخیص سویه‌های مقاوم از سویه‌های حساس، ضروری است مقادیر MIC[5] برای آنتی بیوتیک‌ها توصیه شده تعیین شود. در نتیجه از سویه‌هایی که مقاومت اکتسابی نشان می‌دهند نباید به عنوان افزودنی خوراک استفاده شود، بجز زمانی‌که اساس مقاومت مشاهده شده موتاسیون کروموزومی باشد (EFSA 2018). زیرا مصرف باکتری‌های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی اکتسابی خطر انتشار آن

1 Qualified presumption of safety
2 Food and Agriculture Organization
3 World Health Organization
4 European Food Safety Authority
5 Minimum Inhibitory Concentration

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

در میکروبیوتای دستگاه گوارش و به طور کلی محیط را به همراه دارد. تتراسایکلین به دلیل فعالیت ضد باکتریایی با دامنه وسیع، هزینه تولید پایین و عدم بروز عوارض جانبی جدی، آنتی بیوتیکی است که استفاده گسترده‌ای در طب انسانی و دامپروری دارد (Jamal et al. 2017). مکانیسم اثر تتراسایکلین، همانند آنتی بیوتیک‌های MLS[۶]، آمینوگلیکوزیدها و کلرامفنیکل بر اساس مهار سنتز پروتئین در سلول‌های باکتریایی است. تتراسایکلین به زیر واحد 30S ریبوزوم‌ها متصل می‌شود و از اتصال tRNA[۷] های حامل اسیدهای آمینه جلوگیری می‌نماید (Dec et al. 2017).

بدلیل استفاده گسترده و غیرمنطقی از این آنتی بیوتیک، مقاومت باکتریایی نسبت به تتراسایکلین به یک نگرانی جدی تبدیل شده است (Rudra et al. 2018) وجود ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین به عنوان عامل اصلی مقاومت نسبت به تتراسایکلین در گونه‌های باکتریایی می‌باشد (Tao et al. 2010). بیشتر ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین وابسته به نوع باکتری بوده و از طریق پلاسمیدهای قابل انتقال و ترانسپوزون ها به سرعت در میان باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش انسان، حیوانات و محیط زیست پخش می‌شوند و تهدید بزرگی برای سلامت انسان و حیوانات است (Ma et al. 2021). هدف از این مطالعه تعیین حساسیت جدایه‌های لاکتوباسیلوسی جداسازی شده از دستگاه گوارش مرغ‌های بومی ایران نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین وشناسایی ژن‌های مقاومت در آن‌ها بر اساس روش توصیه شده توسط EFSA بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌ها و شرایط رشد آن‌ها: جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* مورد بررسی در مطالعه حاضر از محتویات دستگاه گوارش مرغ‌های بومی استان‌های گیلان، آذربایجان غربی و خوزستان جداسازی و پتانسیل پروبیوتیک آن‌ها (نظیر مقاومت به اسید، بایل، مهار پاتوژن‌ها و...) در دو مطالعه انجام شده توسط رویان و همکاران ارزیابی گردید و با روش 16sRNA[۸] تعیین هویت گردیدند ودر بانک ژنی NCBI[۹] ثبت گردیدند (Royan et al. 2018; Royan et al. 2019). محیط کشت MRS[۱۰] فاقد آگار حاوی جدایه‌های مذکور با اسکیم میلک ۱۰ درصد و گلیسرول ۶۰ درصد با نسبت ۱/۱مخلوط شده و در و در فریز ۸۰- ذخیره گردیدند. به‌منظور بررسی مقاومت نسبت به تتراسایکلین، کشت‌های ذخیره شده در فریزر ۸۰-، در محیط کشت MRS فاقد آگار استریل تحت شرایط میکروآئروفیلیک ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب فعال گردیدند. پس از آن کشت‌هایی با استفاده از تلقیح یک درصد کشت مایع در محیط MRS مایع استریل جدید تهیه و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک شب به منظور انجام تست حساسیت آنتی بیوتیک گرمخانه‌گذاری گردیدند.

6 Macrolide, Lincosamide and Streptogramin
7 transfer RNA
8 *16S ribosomal* RNA
9 *National Center for Biotechnology Information*
10 Man–Rogosa–Sharpe

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر پایه حداقل غلظت بازدارندگی: مقادیر MIC جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* مورد بررسی نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین (Sigma-Aldrich, USA) توسط روش ساخت رقت‌های سریالی (Broth Microdilution) ارزیابی گردید (Klare et al. 2005). بدین منظور، از ذخیره اصلی تتراسایکلین در محیط کشت LSM[11] (MRS broth+Iso-Sensitest(Oxoid, UK)) رقت‌های ۱۲۸–۰/۲۵ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس از جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* منتخب گرمخانه‌گذاری شده طبق مراحل قبلی، سوسپانسیونی به غلظت OD_{600nm} [12] =۰/۲ تهیه گردید. سپس سوسپانسیون باکتریایی به رقت‌های آنتی‌بیوتیکی موجود در چاهک‌های پلیت ۹۶ تایی اضافه و میزان رشد جدایه‌های باکتریایی در رقت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین طی زمان‌های صفر و ۲۴ ساعت در دمای مناسب رشد باکتری، ثبت گردید. دستورالعمل‌های پانل EFSA FEEDAP[13] (EFSA 2018) برای تفسیر نتایج مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی با استاندارد EFSA مقایسه شد. جدایه‌هایی که غلظتی بالاتر از نقاط شکست ارائه شده در جدول EFSA (2018) نشان دادند، مقاوم شناخته شدند (EFSA 2018).

ردیابی ژن‌های مقاومت به تتراسایکلین با استفاده از PCR: از کیت استخراج DNA سینا کلون و روش Birnboim and Doly (1979) به ترتیب برای استخراج DNA و پلاسمید جدایه‌های دارای مقاومت فنوتیپی نسبت به تتراسایکلین استفاده شد. سپس برای شناسایی ژن‌های مقاومت نسبت به تتراسایکلین از چهار جفت آغازگر مرتبط با ژن‌های tet(L)، tet(M)، tet(O) و tet(W) استفاده شد (جدول ۱). تعیین کیفیت نمونه‌های استخراج شده به کمک الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد انجام شده و بررسی کمی آن‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (نانودراپ) انجام گردید و پس از رقیق‌سازی همه نمونه‌ها به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر جهت انجام پی‌سی‌آر اختصاصی آماده شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس متد توصیه شده Muñoz et al. (2014) انجام شد (Munoz et al. 2014).

نتایج و بحث

یکی از نکات مهم در ارزیابی ایمنی زیستی باکتری‌های پروبیوتیک، پتانسیل انتقال ژن‌های مقاومتِ آنتی‌بیوتیکی بین باکتری‌های دستگاه گوارش توسط آن‌ها می‌باشد (Nawaz et al. 2011). بر اساس توصیه سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا افزودنی‌های میکروبی به منظور جلوگیری از افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی نباید به خزانه ژن‌های مرتبط با این مقاومت در جمعیت باکتریایی دستگاه گوارش چیزی بیافزایند (EFSA 2018). بر مبنای آخرین تجدید نظر سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۶

[11] LAB Susceptibility test Medium
[12] Optical Density
[13] The Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed

آنتی‌بیوتیک‌هایی که باید از بروز مقاومت نسبت به آن‌ها جلوگیری نمود، آنتی‌بیوتیک‌های مهم مورد استفاده در پزشکی و دامپزشکی هستند .

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده جهت بررسی ژنوتیپی مقاومت نسبت به تتراسایکلین

Table 1. Primers used for genotypic investigation of tetracycline resistance

ژن هدف Target gene	توالی آغازگر (′۳→′۵) Primer sequence (5′→3′)		رفرنس Ref
ژن تتراسایکلین ال tet(L)gene	پرایمر رفت Forward primer	tet(L)-2-1: CATTTGGTCTTATTGGATCG	Aarestrup et al. (2000)
	پرایمر برگشت Reverse primer	tet(L)-2-2: ATTACACTTCCGATTTCGG	
ژن تتراسایکلین ام tet(M)gene	پرایمر رفت Forward primer	tet(M)-1: GTTAAATAGTGTTCTTGGAG	Aarestrup et al. (2000)
	پرایمر برگشت Reverse primer	tet(M)-2: CTAAGATATGGCTCTAACAA	
ژن تتراسایکلین او tet(O)gene	پرایمر رفت Forward primer	tet(O)-1: GATGGCATACAGGCACAGAC	Aarestrup et al. (2000)
	پرایمر برگشت Reverse primer	tet(O)-2: CAATATCACCAGAGCAGGCT	
ژن تتراسایکلین دبلیو tet(W)gene	پرایمر رفت Forward primer	tet(W): GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	Airstrips et al. (2000)
	پرایمر برگشت Reverse primer	tet(W): GGGCGTATCCACAATGTTAAC	

مقاومت نسبت به تتراسایکلین از جمله مهمترین مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی شناخته شده می‌باشد که به فراوانی در لاکتوباسیلوس‌ها مطالعه گردیده‌است. تتراسایکلین‌ها از جمله عوامل ضد باکتریایی وسیع الطیفی هستند که در برابر انواع بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های بیماری‌زای هوازی، بی هوازی، گرم مثبت و گرم منفی و همچنین برخی از انواع تک یاخته‌ها نیز مناسب هستند و به طور گسترده‌ای در دامپزشکی به‌منظور پیشگیری، درمان بیماری‌های عفونی و همچنین به عنوان افزودنی‌های محرک رشد در خوراک دام و طیور عمل می‌نمایند (Aalipour et al. 2015). به منظور بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی پروبیوتیک‌ها نیاز است که ابتدا تست فنوتیپی MIC به‌منظور تعیین حداقل غلظت ماده ضد میکروب که از رشد باکتری جلوگیری می‌کند با روشی ثابت و با استفاده از متدهای استاندارد بین‌المللی انجام گیرد. به‌عنوان یک نیاز اساسی مقادیر نقطه برش برای هریک از آنتی بیوتیک‌های توصیه شده توسط سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا بر اساس گونه مشخص گردیده‌است. بر اساس متد سازمان ایمنی

مواد غذایی اروپا، میکروارگانیسم‌ها در دو دسته حساس (زمانی که رشد سویه در غلظت مساوی یا کمتر از مقدار نقطه برش متوقف می‌شود ($S \leq x$ mg/L) و مقاوم (هنگامی که قادر به رشد در غلظتی از ضد میکروب خاص بالاتر از نقطه برش تعیین شده می‌باشند ($R > x$ mg/L) قرار می‌گیرند (EFSA 2018). در این مطالعه، حساسیت آنتی بیوتیکی ۳۶ جدایه *لاکتوباسیلوسی* دارای پتانسیل پروبیوتیک که از بخش‌های چهارگانه دستگاه گوارش (دئودنوم، ژئوژنوم، ایلئوم و سکوم) مرغ‌های پرورش یافته در مناطق روستایی استان‌های گیلان، آذربایجان غربی و خوزستان در دو مطالعه پیشین جداسازی شده بودند (Royan et al. 2018; Royan et al. 2019)، نسبت به تتراسایکلین با روش رقت سازی در محیط مایع (NCCLS 1997; Klare et al. 2005) ارزیابی گردید. در این مطالعه بر اساس معیارهای توصیه شده سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا چهار جدایه *L. reuteri*[14]، سه جدایه *L. salivarius*، دو جدایه *L. crispatus* و چهار جدایه *L. johnsonii* جمعا سیزده نمونه (۳۶/۱۱ درصد) مقاومت فنوتیپی نسبت به تتراسایکلین نشان دادند (جداول ۲، ۳، ۴ و ۵).

جدول۲. مقادیر MIC تتراسایکلین جدایه‌های *L. salivarius* دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران

Table 3. Tetracycline MIC values of *L. salivarius* isolates from digestive system of Iranian backyard chickens

نام جدایه	حداقل غلظت بازدارندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)									
isolate name	Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
L. salivarius ABRIIN27	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❋
L. salivarius ABRIIN33	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❋
L. salivarius ABRIIN39	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❋
نقطه برش مقاومت تتراسایکلین= ۸ Tetracycline Cut-0ff value= 8										
(Resistance *L. salivarius* isolates / *L. salivarius* isolates) =3/3										
3/3= (جدایه‌های *L. salivarius* / جدایه‌های *L. salivarius* دارای مقاومت)										

مشابه نتایج مطالعه حاضر شیوع بالای مقاومت نسبت به تتراسایکلین (۶۸ درصد سویه‌ها) در میان جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از مزارع پرورش بوقلمون در لهستان مشاهده گردید (Dec et al. 2018). همچنین ۷۴ درصد از جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* جداسازی شده از فارم‌های جوجه گوشتی لهستان نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند (Dec et al.

14 *Lactobacillus*

2018). همچنین نزدیک به ۸۰ درصد از *لاکتوباسیل‌های* جداسازی شده از مزارع جوجه‌گوشتی بلژیک نیز نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاوم هستند (Cauwerts et al. 2006).

جدول ۳. مقادیر تتراسایکلین جدایه‌های *L. reuteri* دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران

Table 2. Tetracycline MIC values of *L. reuteri* isolates from digestive system of Iranian backyard chickens

نام جدایه isolate name	حداقل غلظت بازدارندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
*L. reuteri*ABRIIN29	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIIN30	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIIN31	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIIN35	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIIN36	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❊
*L. reuteri*ABRIIN38	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❊
*L. reuteri*ABRIG2	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG3	–	–	–	–		❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG4	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG6	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❊
*L. reuteri*ABRIG8	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
L. reuteri ABRIG9	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG11	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG12	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG13	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG15	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG17	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG18	–	–	–	❊	–	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG19	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG20	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG21	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❊
*L. reuteri*ABRIG22	–	–	–	–	❊	–	–	–	–	–
*L. reuteri*ABRIG23	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–
L. reuteri ABRIG25	–	–	–	–	–	❊	–	–	–	–

نقطه برش مقاومت تتراسایکلین= 32 Tetracycline Cut-0ff value=32

(Resistance *L. reuteri* isolates /*L. reuteri* isolates) =4/26

4/26= (جدایه‌های *L. reuteri* / جدایه‌های *L. reuteri* دارای مقاومت)

جدول٤. مقادیر MIC تتراسایکلین جدایه‌های *L. crispatus* دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران

Table 4. Tetracycline MIC values of *L. crispatus* from digestive system of Iranian backyard chickens

نام جدایه isolate name	حداقل غلظت بازدارندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
*L.crispatus*ABRIIN32	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❋
*L.crispatus*ABRIIN34	–	–	–	–	-	–	–	–	–	–
*L.crispatus*ABRIIN37	–	–	–	–	–	–	–	–	–	❋
نقطه برش مقاومت تتراسایکلین= 4 4 =Tetracycline Cut-0ff value										
(Resistance *L. salivarius* isolates / *L. salivarius* isolates) =2/3										
2/3= (جدایه‌های *L. salivarius* / جدایه‌های *L. salivarius* دارای مقاومت)										

جدول٥. مقادیر MIC تتراسایکلین جدایه‌های *L. johnsonii* دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران

Table 5. Tetracycline MIC values of *L. johnsonii* isolates from digestive system of Iranian backyard chickens

نام جدایه Isolate name	حداقل غلظت بازدارندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) Minimum Inhibitory Concentration (µg/mL)									
	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
*L. johnsonii*ABRIG5	–	–	–	–	–	❋	–	–	–	–
*L. johnsonii*ABRIG7	–	–	–	–	–	❋	–	–	–	–
*L. johnsonii*ABRIG14	–	–	–	–	–	❋	–	–	–	–
*L. johnsonii*ABRIG24	–	–	–	–	–	❋	–	–	–	–
نقطه برش مقاومت تتراسایکلین= 4 4 =Tetracycline Cut-0ff value										
(Resistance *L. johnsonii* isolates / *L. johnsonii* isolates) =4/4										
4/4= (جدایه‌های *L. johnsonii* / جدایه‌های *L. johnsonii* دارای مقاومت)										

مقاومت نسبت به تتراسایکلین و ژن‌های tet در میان سویه‌های *لاکتوباسیلوس* و *لاکتوکوکس* جدا شده از منابع غذایی مختلف از جمله فرآورده‌های گوشتی طیور مشاهده شده است (Aquilanti et al. 2007; Zonenschain et al. 2009). در این مطالعه ژن‌های tet(L) و tet(M) در جدایه‌های *L. salivarius* ABRIIN27، *L. salivarius* ABRIIN33، *L. salivarius* ABRIIN39 مشاهده گردیدند (شکل ۱). حضور ژن tet(O) در سه جدایه *L. johnsonii*ABRIG7، *L. johnsonii*ABRIG14 و *L. johnsonii*ABRIG24 تائید گردید (شکل ۳) و حضور ژن tet(W) در تمامی جدایه‌های مورد بررسی مشاهده شد (شکل ۴). لذا در نتیجه بررسی ژن‌های مقاومت نسبت به تتراسایکلین مشخص گردید که مقاومت فنوتیپی مشاهده

شده درجدایه‌های *L. salivarius* مورد مطالعه ناشی از حضور سه ژن tet(M)، tet(L) و tet(W) می‌باشد. همچنین مقاومت فنوتیپی مشاهده شده در جدایه‌های *L. johnsonii*ABRIG7، *L. johnsonii*ABRIG14 و *L. johnsonii*ABRIG24 مورد مطالعه ناشی از حضور همزمان دو ژن، tet(O) و tet(W) بوده و مقاومت در سایر جدایه‌های مورد بررسی ناشی از حضور ژن tet(W) می‌باشد. مطابق نتایج مطالعه حاضر ژن tet(w) در ۲۴ سویه *L. reuteri* مورد مطالعه ذخیره سازی شده در بانک‌های مختلف میکروبی جهانی مشاهده گردید (Egervärn et al. 2009). درمطالعه‌ای دیگر حضور ژن tet(w) در سویه *L. reuteri* ATCC55730 موجود در محصول پروبیوتیک موجود در بازار ردیابی گردید (Rosander et al. 2008). همچنین حضور ژن tet(w) در جدایه‌های *L. reuteri* بدست آمده از دستگاه گوارش طیور مشاهده شد (Greppi et al. 2020). مطابق نتایج مطالعه حاضر حضور دو ژن tet(M) و tet(L) در ژنوم یک جدایه *L. salivarius* جداسازی شده از دستگاه گوارش توله خوک در حال از شیرگیری تائید گردیدند (Jin et al. 2017). همچنین حضور ژن‌های tet(L)، tet(M) و tet(w) در جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* جداسازی شده از مزارع پرورش بوقلمون لهستان و همچنین لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از مرغداری‌های جوجه گوشتی لهستان (Dec et al. 2017) و بلژیک (Cauwerts et al. 2006) مشاهده گردیده است. بعلاوه مشخص گردیده است که ژن‌های tet(w) و tet(M) در میان لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده ازدستگاه گوارش انسان و محصولات غذایی فراوان هستند (Klare et al. 2005). در مطالعه انجام شده توسط Johnson et al (2023) تمامی جدایه‌های *L. johnsonii* جداسازی شده از بوقلمون حاوی ژن tet(w) بوده و بیش از پنجاه درصد سویه‌ها حاوی ژن tet(L) می‌باشند. مطالعه انجام شده بر روی ۴۷۸ سویه *لاکتوباسیلوسی* موجود در کلکسیون میکروبی دانشگاه Jiangnan کشور چین مشخص نمود که ۲۳ درصد (۱۰۸/۴۷۸) از سویه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد مطالعه به تتراسایکلین مقاوم هستند و بیشترین میزان مقاومت در دوگونه *L. johnsonii* و *L.crispatus* و به ترتیب به میزان (۱۵/۱۸) ۸۳ درصد و۶۰ درصد (۱۸/۳۰) مشاهده گردید (Ma et al. 2021). همچنین در مطالعه مذکور دو سویه *L. reuteri* و ده سویه *L.crispatus* حاوی هر دو ژن tet(M) و tet(L) بودند. همچنین حضور تکی tet(M) در یک نمونه *L. paracasei*، شش سویه *L. plantarum*، سه سویه *L. reuteri* و دو سویه *L. crispatus* مشاهده گردید. در مطالعه انجام شده توسط Anisimovaو Yarullina (2019)نیز حضور ژن tet(L) در سه نمونه *L. plantarum* جداسازی شده از خوراک‌های تخمیری گیاهی ردیابی گردید.

جدول٦. حضور ژن‌های مرتبط با مقاومت به تتراسایکلین میان جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* دستگاه گوارش مرغ‌های خانگی ایران

Table 6. Presence of genes associated with tetracycline resistance in *Lactobacillus* isolates from digestive system of Iranian backyard chickens

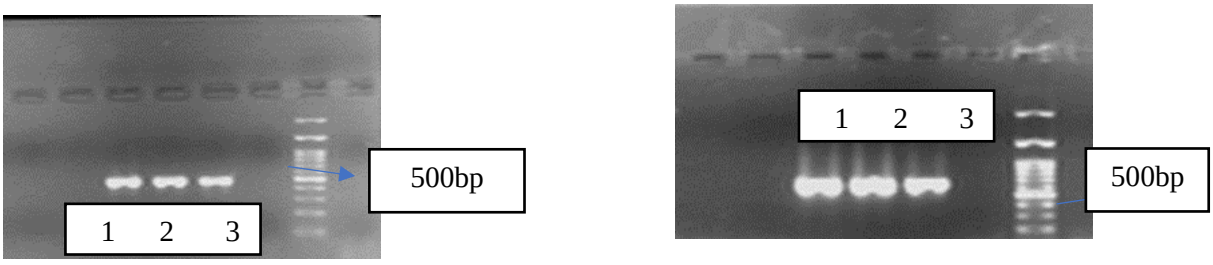
ژن‌های مقاومت تتراسایکلین (bp) Tetracycline resistance gene(bp)	*Lactobacillus* strains سویه‌های لاکتوباسیلوسی												
	L. reuteri				*L. salivarius*				*L. johnsonii*				*L.crispatus*
	ABRIG6	ABRIG21	ABRIG36	ABRIIN38	ABRIIN27	ABRIIN33	ABRIIN39	ABRIG5	ABRIG7	ABRIG14	ABRIG24	ABRIIN32	ABRIIN32
ژن تتراسایکلین ال (456) tet(L) gene (456)	–[a]	–	–	–	❋[b]	❋	❋	–	–	-	–	–	-
ژن تتراسایکلین ام (657) tet(M) gene (657)	–	–	–	–	❋	❋	❋	–	–	–	–	–	–
ژن تتراسایکلین او (781) tet(O) gene (781)	–	–	–	–	–	–	–	-	❋	❋	❋	–	–
ژن تتراسایکلین دبلیو (167) tet(W) gene (167)	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋	❋

[a]. عدم حضور ژنهای کد کننده مقاومت نسبت به تتراسایکلین.

[a.] (–) Lack of genes encoding for tetracycline resistance.

[b]. حضور ژنهای کد کننده مقاومت نسبت به تتراسایکلین.

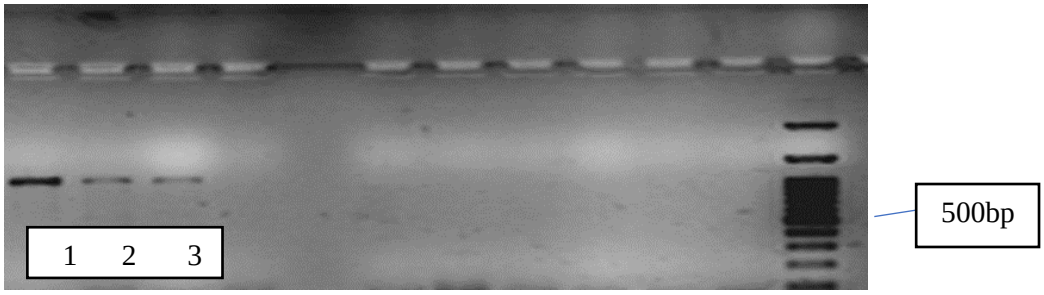
[b.] (+) Presence of genes encoding for tetracycline resistance.



A B

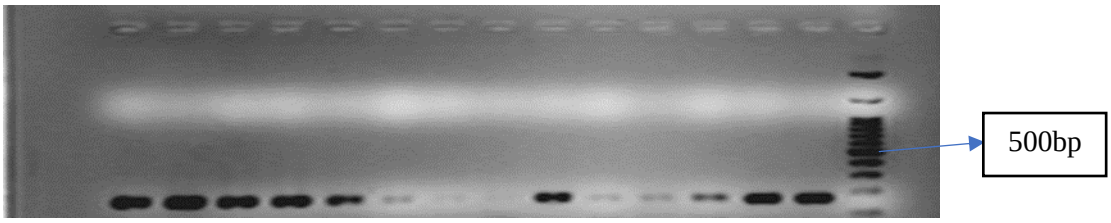
شکل ۱. (A) باند حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز ژن tet(M) با طول ٦٥٧ bp و (B) باند حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز ژن Tet (L) با طول ٤٥٦ bp در دی ان ای پلاسمیدی *L. salivarius* ABRIIN27 (1)، *L. salivarius* ABRIIN33 (2) و *L. salivarius* ABRIIN37 (3).

Figure 1. (A) The band resulting from the polymerase chain reaction of Tet(M) gene h a length of 657 bp and (B) the band resulting from the the polymerase chain reaction of Tet(L) gene with a length of 456 bp in the plasmid DNA of *L. salivations*ABRIIN27 (1), *L. salivarius*ABRIIN33 (2) and *L. salivarius*ABRIIN37 (3).



شکل ۲. باند حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز ژن Tet(O) با طول ۷۸۱ bp در دی ان ای پلاسمیدی *L. johnsonii*ABRIG7 (1)، *L. johnsonii*ABRIG14 (2) و *L. johnsonii*ABRIG24 (3).

Figure 2.The band resulting from the reaction of the Tet(O) gene polymerase chains with a length of 781 bp in the plasmid DNA of the *L. johnsonii*ABRIG7 (1), *L. johnsonii*ABRIG14 (2) and ABRIG24 (3).



شکل ۳. باند حاصل از واکنش زنجیرهای پلیمراز ژن tet(W) با طول ۱۶۷ bp در دی ان ای پلاسمیدی جدایه‌های دارای مقاومت فنوتیپی

Figure 3. The band resulting from the polymerase chain reaction of the tet(W) gene with a length of 167 bp in the plasmid DNA of *lactobacillus* isolates with phenotypic resistance

نتیجه گیری: در این مطالعه نتایج تست‌های فنوتیپی درمیان جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* جداسازی شده از دستگاه گوارش طیور بیانگر وجود مقاومت نسبت به تتراسایکلین در شماری از آن‌ها بود. در این مطالعه چهار جدایه *L. reuteri*، سه جدایه *L. salivarius*، چهار جدایه *L. johnsonii* و سه جدایه *L.crispatus* قادر به رشد در محیط حاوی آنتی بیوتیک تتراسایکلین در غلظت بالاتر از مقادیر تعیین شده حداقل میزان غلظت بازدارندگی تعیین شده برای باکتری‌های مذکور بر اساس توصیه EFSA می‌باشند. بعلاوه نتایج مقاومت فنوتیپی مشاهده شده نسبت به تتراسایکلین بوسیله تست‌های ژنوتیپی مبتنی بر PCR تائید گردید. در این مطالعه حضور ژن tet(W) درتمامی جدایه‌های *لاکتوباسیلوسی* تائید گردید اما ژن tet(L) و tet(M) تنها در سه جدایه *L. salivarius* مورد مطالعه مشاهده گردید و ژن tet(O) نیز در سه جدایه *L. johnsonii* مشاهده گردید. همچنین مشخص گردید مقاومت فنوتیپی تتراسایکلینی

مشاهده شده در جدایه‌های *L. salivarius* مورد مطالعه ناشی از حضور سه ژن tet(M)، tet(L) و tet(W) می‌باشد. مقاومت فنوتیپی مشاهده شده در سه جدایه *L. johnsonii*ABRIG7 ، *L. johnsonii*ABRIG14 و *L. johnsonii*ABRIG24 ناشی از حضور همزمان دو ژن tet(O) و tet(W) می‌باشد لذا با توجه به مقاومت آنتی بیوتیکی مشاهده شده در شماری از جدایه‌های بومی مورد مطالعه و با توجه به تائید حضور ژن‌های مرتبط به آن و خطر انتقال افقی ژن‌های مقاومت نسبت به تتراسایکلین نمی‌توان از سویه‌های دارای مقاومت بعنوان افزودنی پروبیوتیک مناسب تغذیه طیور استفاده نمود.

سپاسگزاری: از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به خاطر حمایت مالی اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. همچنین از سردبیرمحترم و داوران گرامی مجله بیوتکنولوژی کشاورزی به خاطر مطالعه متن مقاله حاضر و ارائه نظرات ارزشمند سپاسگزاری می‌شود.

منابع

رویان مریم، ها شمی مریم، صیقلانی رامین، علائی کردق شلاقی ح سین (۱۳۹۸). ویژگی های پروبیوتیکی و فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوبا سیلوس‌های* جدا شده از لوله گوارش مرغ های بومی جنوب غرب و شمال غرب ایران. بهدا شت مواد غذایی ۹(۳)، ۲۵-۳۹.

محمدی فر آمنه، فقیه ایمانی سید علی، محمدآبادی محمدرضا، سفلایی محمد (۱۳۹۲). تأثیر ژن TGFβ3 بر ارزش های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

References

Anisimova EA, Yarullina DR (2019) Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. Curr Microbiol 76, 1407-1416.

Aalipour F, Mirlohi M, Jalali M, Azadbakht L (2015) Dietary exposure to tetracycline residues through milk consumption in Iran. J Environ Health Sci Engi13, 1-7.

Aquilanti L, Garofalo C, Osimani A, et al. (2007) Isolation and molecular characterization of antibiotic-resistant lactic acid bacteria from poultry and swine meat products. J Food Prot 70, 557–65.

Birnboim, H. Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 7, 1513-1523.

Cauwerts K, Pasmans F, Devriese LA, et al. (2006) Cloacal *Lactobacillus* isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics. Microb Drug Resist 12(4), 284-288.

Chopra I, Roberts M (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev 65, 232–60.

Connell SR, Trieber CA, Dinos GP (2003). Mechanism of Tet (O)-mediated tetracycline resistance. EMBO J 22(4), 945-953.

Das DJ, Shankar A, Johnson JB, Thomas S (2020) Critical insights into antibiotic resistance transferability in probiotic *Lactobacillus*. Nutri 69, 110567.

Dec M, Urban-Chmiel R, Stępień-Pyśniak D, Wernicki A (2017) Assessment of antibiotic susceptibility in *Lactobacillus* isolates from chickens Gut Pathog 9 (1), 1-16.

Dec M, Nowaczek A, Stępień-Pyśniak D et al. (2018) Identification and antibiotic susceptibility of *lactobacilli* isolated from turkeys. BMC Microbiol 18(1), 1-14.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP), Rychen G, Aquilina G et al. (2018) Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA J 16(3), e05206.

Egervärn M, Roos S, Lindmark H (2009) Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. J Appl Microbiol 107(5), 1658-1668.

Felis GE, Dellaglio F (2007) Taxonomy of *lactobacilli* and *bifidobacteria*. Curr Issues Intest Microbiol 8(2), 44-61

Greppi A, Asare PT, Schwab C, et al. (2020) Isolation and comparative genomic analysis of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* from the chicken gastrointestinal tract. Front Microbiol 11, 1166.

Hill C, Guarner F, Reid G, et al. (2014) The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Nat Rev Gastro Hepat 11, 506–514.

Jamal M, Shareef M, Sajid S, (2017) Lincomycin and tetracycline resistance in poultry. Review. Matrix Sci Pharma 1, 33–38.

Jin GD, Lee JY, Kim EB (2017). Draft genome sequence of *Lactobacillus salivarius* KLW001 isolated from a weaning piglet. Korean J Microbiol 53(2), 134-136.

Johnson A, Miller EA, Weber B (2023) Evidence of host specificity in *Lactobacillus johnsonii* genomes and its influence on probiotic potential in poultry. Poul Sci 102(9), e102858.

Khabiri A, Troche R, Mohammadabadi M, Tabatabaeizadeh S (2023) Introduction of a *Newcastle* disease virus challenge strain (sub-genotype VII. 1.1) isolated in Iran. Vet Res Forum 14 (4), 221-228.

Klare I, Konstabel C, Müller-Bertling S, et al. (2005) Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Lactococci*, and *Bifidobacteria*. Appl Environ Microbiol 71, 8982–8986

Klare I, Konstabel C, Werner G, et al. (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. J Antimicrob Chemother 59, 900–912.

Kim SR, Nonaka L, Suzuki S, et al. (2004) Occurrence of tetracycline resistance genes tet(M) and tet(S) in bacteria from marine aquaculture sites. FEMS Microbiol. Lett 237, 147–156.

Ma Q, Pei Z, Fang Z, et al. (2021) Evaluation of Tetracycline Resistance and Determination of the Tentative Microbiological Cutoff Values in Lactic Acid Bacterial Species. Microorganisms 9, e2128.

Milanovi´CV, Maoloni A, Belleggia L, et al. (2023) Tetracycline Resistance Genes in the Traditional Swedish Sour Herring surströmming as Revealed Using qPCR. Genes 14(1), e56.

Leuschner, RG, Robinson TP, Hugas M (2010) Qualified presumption of safety (QPS): A generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). Trends Food Sci Technol 21, 425–435.

Mohammadabadi MR, Nikbakhti M, Mirzaee HR, et al. (2010) Genetic variability in three native Iranian chicken populations of the Khorasan province based on microsatellite markers. Russ J Genet 46, 505-509.

Mohammadifar A, Faghih Imani SA, Mohammadabadi MR, Soflaei M (2014) The effect of TGFb3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. Agri Biotechnol J 5, 125-136 (In Persian).

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. Malays Appl Biol 47, 85-90.

Mohammadifar A, Mohammadabadi MR (2017) The Effect of Uncoupling Protein Polymorphisms on Growth, Breeding Value of Growth and Reproductive Traits in the Fars Indigenous Chicken. Iran J Appl Anim Sci 7, 679-685.

Muñoz MD, Benomar N, Lerma LL et al. (2014) Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. Int J Food Microbiol (172), 110-118.

Nawaz M, Wang J, Zhou A, et al. (2011) Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. Curr Microbiol (62), 1081-1089.

Rokon-Uz-Zaman M, Bushra A, Pospo TA, et al. (2023) Detection of antimicrobial resistance genes in *Lactobacillus* spp. from poultry probiotic products and their horizontal transfer among *Escherichia coli*. Vet Ani Sci 20, 100292.

Royan M, Kordghashlaghi HA, Afraz F, et al. (2018) Screening *Lactobacilli* Isolates from Northern Iran Backyard Chickens as Bio-control Strategy Against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. Kafkas Univ Vet Fak Derg 24(3), 423-430

Royan M, Hashemi M, Seighalani R, Alaie Kordghashlaghi H (2019) The probiotic and antagonistic properties of isolated *Lactobacilli* from the intestine of free-range chickens from southwest and northwest of Iran. J Food Hyg 9(35), 25-39 (In Persian).

Rosander A, Connolly E, Roos S (2008) Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, L. reuteri DSM 17938. Appl Environ Microbiol 74(19), 6032-6040.

Rudra P, Hurst-Hess K, Lappierre P, Ghosh P (2018) High levels of intrinsic tetracycline resistance in *Mycobacterium abscessus* are conferred by a tetracycline-modifying monooxygenase. Antimicrob Agents Chemothe 62, e00119-18.

Shahdadnejad N, Mohammadabadi MR, Shamsadini M (2016) Typing of *Clostridium Perfringens* Isolated from Broiler Chickens Using Multiplex PCR. Genet 3rd millennium 14 (4), 4368-4374.

Shazali N, Foo HL, Loh TC, et al. (2014) Prevalence of antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from the faeces of broiler chicken in Malaysia. Gut Pathog 6, 1–7.

Tao R, Ying GG, Su HC, et al. (2010) Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the Pearl rivers in South China. Environ Pollut 158, 2101–2109.

Zhao R, Sun J, Mo H, Zhu Y (2007) Analysis of functional properties of *Lactobacillus acidophilus*. World J Microbiol Biotechnol (23), 195-200

Zonenschain D, Rebecchi A, Morelli L (2009) Erythromycin- and tetracycline-resistant *lactobacilli* in Italian fermented dry sausages. J App Microbiol 107, 1559–68.