بررسی تاثیر تیمار لاکتوکوکوس لاکتیس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر بیان ژنهای مولد آمین‌های بیوژن در سویه‌های استافیلوکوکوس جدا شده از شیر

محمد علی مسیان مقدم[۱]، سید امیر علی انوار[۱]، کیومرث امینی*[۲]، محمد رضا خانی[۳]

چکیده

این مطالعه تاثیر باکتریهای پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم را بر بیان ژن مولد آمین های بیوژن در استافیلوکوک‌های جدا شده از شیر با استفاده از روش‌های استاندارد بررسی نموده است. جداسازی استافیلوکوکوس‌ها از ۱۰۰ نمونه شیر خام با استفاده از روش‌های استاندارد بیوشیمیایی، رنگ آمیزی گرم و بررسی توالی 16S rRNA انجام شد. نمونه‌های حاوی این سویه ها از نظر تولید آمین‌های بیوژن توسط HPLC مورد بررسی قرار گرفتند و وجود ژن‌های هدف توسط MultiplexPCR تعیین شد. باکتری های واجد ژن های هدف تحت تیمار با سوپرناتانت لاکتوکوکوس لاکتیس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم قرار گرفتند و بیان ژن ها با Real time PCR سنجیده شد. داده ها نشان داد که ۶۰ سویه استافیلوکوکوس جداسازی شد که در ژنوم ۵۴ سویه ژنهای هدف حضور داشتند و در ۳ نمونه میزان کادآورین و پوترسین در بیشترین حالت خود بود. مقادیر آمین های بیوژن در روزهای دوم و سوم تیمار نسبت به روز اول به صورت معنی داری بیشتر بود ($p<0,001$). نتایج MIC به دست آمده برای باکتری های استافیلوکوکوس در معرض باکتری های پروبیوتیک در نمونه ها بین ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نتایج حاصل از واکنش Real Time PCR نشان داد که میانگین کاهش سطح تغییرات بیان هر دو ژن از نظر آماری معنی دار بوده است. این مطالعه نشان داد که استفاده از باکتری های پروبیوتیک میتواند از طریق کاهش جمعیت این باکتری ها و کاهش بیان ژن مولد کادآورین و پوترسین ، منجر به کاهش تولید این آمین و افزایش کیفیت شیر گردد.

واژگان کلیدی: شیر، استافیلوکوکوس، کادآورین ، پوترسین، پروبیوتیک.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۱۳

مقدمه

امروزه شیر و محصولات لبنی از مهمترین مواد غذایی در جهان میباشند و تولید کافی و رعایت نکات بهداشتی در مراحل تولید و نگهداری آنها از اهمیت بالایی برخوردار است. این ماده غذایی از مهمترین نیازهای بشری به آلی است محیط مناسبی برای رشد انواع میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده مسمومیت غذایی به شمار میرود. از این رو بهداشت شیر و حذف میکروارگانیسم های پاتوژن و محصولات آنها اعم از سموم و آمین های بیوژن بسیار ضروری است(۱،۲). مهمترین میکروارگانیسم‌های آلوده کننده شیر شامل *استافیلوکوکوس اورئوس*، کلی فرم‌ها، *لیستریامونوسایتوژنز*، بروسلا، سالمونلا، مایکوباکتریوم‌ها و آسپرژیلوس است. همچنین آلوده کننده‌های شیمیایی مثل ملامین، فلزات سنگین و بقایای آنتی بیوتیک های استفاده شده در دامپروری نیز در این زمینه مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند (۳). از بین محصولات مضر باکتری‌های آلوده کننده شیر، آمین های بیوژن اهمیت فراوانی دارند. آمین های بیوژنیک ترکیبات اساسا نیتروژنی هستند که عمدتاً با دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه یا با آمیناسیون و انتقال آلدهیدها و کتون ها تشکیل می‌شوند. آمین های بیوژنیک مولکولهای های آلی با وزن مولکولی کم هستند و در اثر متابولیسم میکروبی، گیاهی و حیوانی سنتز می‌شوند (۱, ٤) . آمین‌های بیوژنیک تولید شده از *استافیلوکوکوس اورئوس* مثل کادآورین، هیستامین، تیرامین و پوترسین به عنوان عامل مسمومیت بالقوه برای انسان محسوب شده و اثرات سمی گزارش شده از آنها با توجه به شرایط فیزیولوژیکی فرد و در حضور سایر فاکتورهای دیگر، شبیه به داروهایی است که میتوانند فعالیت سینرژیستی یا آنتاگونیستی داشته باشند (۵). کاداورین و پوترسین از مهم ترین آمین های بیوژن هستند

۱ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران

۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران(dr_kumarss_amini@yahoo.com)

۳ گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

که در سال ۱۸۸۵ کشف شدند و خواص سمی را از خود بروز میدهند. کاداورین با دکربوکسیلاسیون اسید آمینه لیزین توسط آنزیم لایزین دکربوکسیلاز (ژن CAD) تولید میگردد و میزان ۲۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم آن برای موش کشنده بوده است. پوترسین یکی از فراوان‌ترین و مهمترین پلی‌آمین های موجود در محصولات لبنی است که میتواند در اثر آلودگی های میکروبی در شیر افزایش یابد(٦). اورنیتین و آگماتین اصلی‌ترین عناصر مورد نیاز برای تولید پوترسین از طریق مسیرهای مختلف بیوشیمیایی هستند. تولید پوترسین از اورنیتین و آگماتین بستگی به باکتری تولید کننده، ژن ها و آنزیم های موجود در آن و عوامل محیطی دارد. ژن اورنیتین دکربوکسیلاز (ژن ODC) مهمترین ژن دخیل در تولید پوترسین است. مطالعات نشان داده است که ژنهای دیگری نیز در مسیر تبدیل آگاماتین به پوترسین نقش ایفا مینمایند اما میزان آن بسیار نادر است و نیز مسیر تولید پوترسین از آگاماتین بیشتر در باکتری های گونه سالمونلا و سودوموناس رخ میدهد (٦). شناسایی و کاهش میزان این آمین‌های بیوژن در نمونه های غذایی به دلیل سمیت آن و استفاده از آن به عنوان شاخص کیفی غذا حائز اهمیت بالایی است (۷).

امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان نگهدارنده های طبیعی مواد غذایی و عواملی مهم در پیشگیری از بیماری‌ها، کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی و بهبود وضعیت سلامتی انسان و دام شناخته می‌شوند (۸). به طور کلی تاثیر باکتری‌های پروبیوتیک بر سایر میکروارگانیسم ها از طریق تغییر در اسیدیته و گلوکز محیط روده، ترشح آنزیم ها و سموم ضدمیکروبی، تغییر در بیان ژن‌های بیماری‌زا و رقابت در مصرف مواد غذایی اعمال می‌شود(۹). *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* از مهمترین پروبیوتیک های مورد استفاده در صنعت مواد غذایی هستند که میکروفلور طبیعی روده بوده و امروزه استفاده از آنها در نگهداری مواد لبنی فراگیر است. این مطالعه در نظر داشته است تا تاثیر پروبیوتیک های *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* را بر بیان ژن‌های مولد پوترسین و کاداورین استافیلوکوکوس های جدا شده از شیر را مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌کار

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌ها

به منظور انجام این مطالعه، ۱۰۰ نمونه ۲۰۰ میلی‌لیتری شیر خام با توجه به استاندارد ملی ایران مربوط به نمونه برداری از شیر به شماره ۳۲٦ (۱۰) تهیه گردید. نمونه ها بدین شکل جمع آوری شدند که ۵ نمونه از مراکز جمع آوری شیر شرکت‌های صنعتی دارای بیشترین تولید مواد لبنی در استان تهران تهیه شد. برای ۹۵ نمونه دیگر، به صورت تصادفی ۵ گروه ۱۹ تایی از گاوداری‌های استان تهران انتخاب شدند. هر گروه ۱۹تایی تحت پوشش یکی از مراکز جمع آوری شرکت‌های صنعتی بودند و از تانکرهای ذخیره شیر آنها مطابق دستور العمل استاندارد ملی ایران به شماره ۳۲٦ نمونه برداری صورت گرفت. به منظور شناسایی باکتری های موجود در نمونه های شیر، از رقت 10^{-4} شیر خام کشت میکروبی تهیه شد و از روشهای استاندارد بیوشیمیایی و رنگ آمیزی گرم استفاده گردید. همچنین بررسی‌های ژنومی 16SrRNA برای تایید تشخیص افتراقی انواع استافیلوکوکوس استفاده شد. سویه های شناسایی شده در محیط BHI Broth دارای ۱۸٪ گلیسرول و در دمای ۷۰- فریزر نگهداری شدند.

بررسی مولکولی

به منظور بررسی ژنومی و شناسایی دقیق باکتری‌های استافیلوکوکوس، با استفاده از پرایمر های عمومی توالی 16srRNA (جدول ۱)سویه های جداسازی شده مورد

بررسی قرار گرفت. سپس از روش PCR چندگانه به منظور افتراق و تشخیص گونه های استافیلوکوکوس استفاده شد. در مرحله بعد برای شناسایی استافیلوکوکوس‌های دارای ژن لایزین دکربوکسیلاز و اورنیتین دکربوکسیلاز از روش PCR استفاده شد. استخراج DNA باکتری های شیر که در محیط کشت رشد یافته بودند توسط کیت اختصاصی (QIAamp DNA Mini Kit, Germany) و با توجه به دستورالعمل سازنده انجام گردید. پس از تایید کیفیت توسط دستگاه نانودراپ (Eppendorf, Germany) پرایمر های اختصاصی ژن هدف توسط نرم افزار Gene runner طراحی گردید و در سایت NCBI بلاست شد تا اختصاصی بودن آن تایید گردید. پرایمرهای اختصاصی ژن های ذکر شده در جدول ۱ برای افتراق سویه های استافیلوکوکوس به کار رفتند. توالی اختصاصی ژن های Sap برای *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*، ژن nuc برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، sep برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، CT103 برای *استافیلوکوکوس کپتیس*، ژن bap برای *استافیلوکوکوس هایکوس*، ژن sraP برای *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* و ژن agrD برای باکتری *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* به منظور طراحی پرایمر مورد استفاده قرار گرفتند. مقادیر مواد PCR برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر PCR Master Mix 2x (Amplicon, USA)، ۱ میکرولیتر از هر کدام یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ٤ میکرولیتر از DNA الگو (۱۵۰ نانوگرم) و ٤ میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل دمایی واکنش PCR بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ٥٦ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR در حضور کنترل منفی در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردیدند و پس از رنگ آمیزی با اریتروژل توسط دستگاه ژل داک (MahamAzma, Iran) از آنها عکسبرداری شد.

اندازه گیری آمین های بیوژن با استفاده از روش HPLC

نمونه‌هایی که از آنها استافیلوکوکوس‌های مولد پوترسین و کاداورین جداسازی شده بود تحت بررسی با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا قرار گرفتند تا کمیت این آمین‌های بیوژن تعیین شوند. سیستمHPLC شامل یک سیستم کروماتوگرافی HPLC(Waters corporation, USA) دارای یک دتکتور UV٤٨٦ ، یک مدل کنترلر مدل ٦۰۰ و یک پمپ مدل ٦۰۰ و ستون Silica for powerful LC separationنووا پک و مجهز به یک ستون حفاظتیC18 بود. بررسی مقادیر پوترسین و کاداورین در ساعت صفر، ٢٤ ،٤٨ و ۷۲ ساعت بعد از نمونه گیری صورت میگرفت. آماده سازی نمونه ها با انجام اصلاحات جزئی در روش (Moret and conte,1969) از طریق استخراج اسیدی و مشتق سازی صورت گرفت. جهت اندازه گیری آمین های بیوژن با روش HPLC از ستون Silica for powerful LC separation استفاده شد. فاز متحرک، ترکیبی از آب و استونیتریل با نسبت v/v ۱۸:۸۸ بود و پیک های تولیدی دستگاه در ۲٥٤ نانومتر شناسایی و ارزیابی شد. به منظور آماده سازی استاندارد داخلی میزان ۵ میلی گرم از پوترسین دی هیدروکلراید و کاداورین دی هیدروکلراید (هر دو با ۹۹ درصد خلوص) (Merck, Germany) به طور دقیق وزن شده و در ۵۰ میلی لیتر از آب (با درجه HPLC) حل شده و در ٤ درجه نگهداری شدند. برنامه شیب غلظت مورد استفاده با سرعت جریان (flow-rate) ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه بود. سپس در یک لوله آزمایش ۵ میلی لیتر محلول استخراج اسیدی را با ۵ میلی لیتر بوتانول مخلوط کرده و به مدت ۲ دقیقه ورتکس شد و این عمل برای ۳ مرتبه تکرار و نهایتا

استخراج با حلال آلی (بوتانول) بدست آمد. مقادیر آمین های تولید شده در نمونه ها بررسی گردید و با شناسایی باکتری‌های تولید کننده بیشترین میزان پوترسین و کاداورین به صورت همزمان، این سویه‌ها در معرض سوپرناتانت (CFS, cell free supernatant) باکتری‌های پروبیوتیک قرار گرفتند تا تاثیر محصولات این باکتری های پروبیوتیک بر بیان ژن مولد آمین های بیوژن مشخص شود.

استخراج سوپرناتانت پروبیوتیک‌ها و تعیین MIC

به منظور استخراج سوپرناتانت ابتدا پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* (ATCC 11454) و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (PTCC 1076) خالص شده در محیط MRS Broth، از انستیتو پاستور ایران تهیه شده و در شرایط بی هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۵ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتیگراد با دور ٤۰۰۰، سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت با احتیاط از بخش رویی لوله جدا شده و با استفاده از یک فیلتر با سایز ۰,۲۲ میکرومتر (Millipore, USA) به لوله استریل انتقال یافت. طبق از روش استاندارد پیشنهادی توسط کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (CLSI) حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) به کمترین مقدار از هر عامل ضد میکروبی اطلاق می شود که می تواند به طور قابل توجهی رشد یک ارگانیسم را پس از گذشت یک دوره انکوباسیون مشخص مهار نماید. مقادیر MIC برای هر یک از باکتری های در تماس با سوپرناتانت بدون سلول پروبیوتیک های *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* با توجه به مطالعه امین نژاد و همکاران به بدست آمد (۱۱). در این روش از دو میکروپلیت ۹٦ خانه ای با ۱۲ ردیف که هر کدام حاوی۱۰۰ میکرولیتر محیط استریل تریپتیک سوی براث (TSB) بودند، استفاده گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوپرناتانت به ردیف اول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط تریپتیک سوی براث اضافه و رقیق سازی تا چاهک دهم (۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته و به چاهک دوم ریخته میشد و تا چاهک دهم ادامه میافت) انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت نیم مک فارلند به همه چاهک ها اضافه شد. همچین از دو ردیف چاهک یازدهم و دوازدهم به عنوان کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون میکروبی) و کنترل منفی تست (محیط کشت و DMSO) استفاده شد. سپس میکروپلیت ها در انکوباتور شیکردار (۱۵۰ دور در دقیقه، دمای ۳۷ درجه و حداکثر مدت زمان ۲٤ ساعت) گرمخانه گذاری گردید. میکروپلیت ها در مدت ۱۸-۲٤ ساعت در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفته و گرمخانه شدند. سپس کدورت هر خانه بررسی شد، اولین خانه از هر ستون که باکتری در آن رشد نکرده بود به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته می‌شد.

بررسی بیان ژن‌های هدف

به منظور بررسی تغییرات سطح بیان ژن‌های هدف در باکتری‌های تولید کننده پوترسین و کاداورین در اثر تیمار با سوپرناتانت بدون باکتری پروبیوتیک ها از روش Reverse Transcription-PCR همراه با Real time PCR استفاده گردید. استخراج RNA توسط کیت اختصاصی (سیناژن، ایران) با توجه به پروتوکل آن انجام شد. با تایید کیفیت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ، سنتز CDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMV با غلظت 25 µl/unit توسط کیت اختصاصی آن (سیناژن، ایران) انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت اختصاصی (سیناژن، ایران) به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از پرایمر فوروارد، یک میکرولیتر از پرایمر ریورس، یک میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه های مورد نظر در دستگاه Real Time PCR مدل

جدول ۱: پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه به منظور جداسازی باکتری های استافیلوکوکوس حاوی ژن هدف

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول (bp)
SapF	5'-AAC GGG CGT CTC GAT AGA AAA-3'	۳۸۰
sapR	5'-AAC GGG CGT CCA CAA AATCA-3'	
NucF	5'-TCG CTT GCT ATG ATT GTG G-3'	٦٥٩
nucR	5'-GCC AAT GTT CTACCATAG C-3'	
SepF	5'-CAG TTA TAC GGT ATG AGA GC-3'	۲۱۹
sepR	5'-CTG TAG AGT GAC AGT TTG GT-3'	
CT103F	5'-TCAGATATTCAAACTGCAGTACG-3'	۱۰۳
CT103R	5'-CTACTTCACCTTTTTCTTCAGA-3'	
srapF	5'F-AGAAACAAGCTGGTCAAG-3'	۲۷۱
srapR	5'R- CTGCGTAGTTAAGAAAATC-3'	
bapF	5'- TAC GGT CAG TTA ATG AGA GC-3'	۷۹۳
bapR	5'- AGT GAC CTG TAG AGT TTG GT-3'	
agrDF	5'-GGGTAATTACCGATCTATGATCGC -3	٤۳۰
agrDR	5'-ATTCCACCTTTGTTAGCACAACAC-3'	
16srRNAF	5'-ACGGTCTTGCTGTCACTTATA-3'	۳۳٥
16srRNAR	5'-TACACATATGTTCTTCCCTAATAA-3'	

جدول ۲: توالی پرایمر های استفاده شده در این مطالعه

نام ژن	Primer sequence	سایز محصول (جفت باز)
Forward CAD	5'-ACCGATCTATGATGCGAATT -3'	**108**
Reverse CAD	5'-ACCTTTGACTTAGCACAAAGGC-3'	**108**
Forward ODC	5'-CGTTCACAATCAGTTCTT-3'	**152**
Reverse ODC	5'-CCAACTTCTTCTTCCATTTG-3'	**152**
Forward rpoB	5'-CGTTCACAATCAGTTCTT-3'	**210**
Reverse rpoB	5'-CCAACTTCTTCTTCCATTTG-3'	**210**

step one plus (ترموفیشر،آلمان) با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتیگراد برای مدت ٤۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد برای ٦۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانه‌دار *rpoB* به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد.

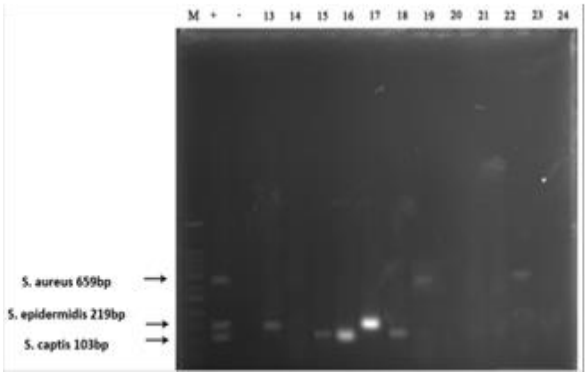
نتایج

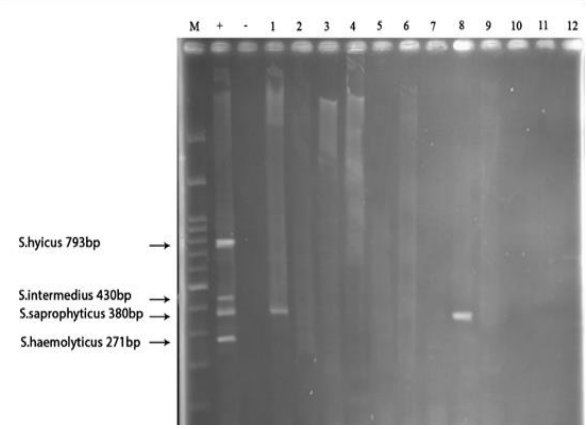
نتایج جداسازی باکتری‌ها

از ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شده، پس از کشت در محیط اختصاصی برد پارکر و تشخیص افتراقی استافیلوکوکوس‌ها نشان داده شد که در ۳٤ نمونه هیچ‌گونه باکتری مشاهده نگردیده اما در ٦٦ نمونه شیر جمع آوری شده باکتریهایی شامل انواع استافیلوکوکوس (٦۰ نمونه)، *اشرشیا کلای* (٤ نمونه)، و سایر کلی فرم‌ها (۲ نمونه) مشاهده شد. از آنجا که این مطالعه بر روی بررسی مقادیر کاداورین و پوترسین تولیدی از استافیلوکوکوس ها متمرکز بوده است، ٦ نمونه دارای *اشرشیاکلای* و کلی‌فرم از مطالعه کنار گذاشته شدند.

نتایج Multiplex PCR برای تشخیص افتراقی باکتری ها

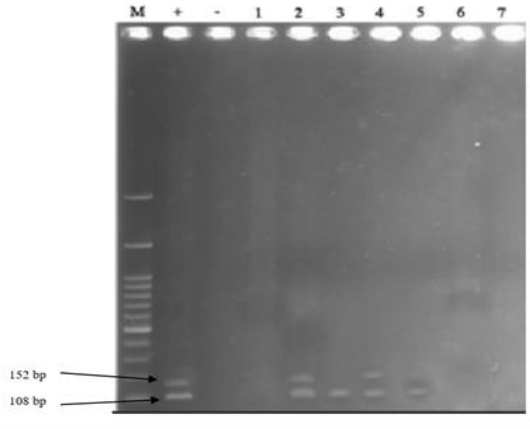
داده‌های حاصل از بررسی ژنومی 16srRNA و تکثیر ژن های هدف در باکتری‌ها نشان داد که از ٦٠ نمونه حاوی انواع باکتری های استافیلوکوکوس شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (٢٣ نمونه)، *استافیلوکوکوس همولیتیکوس* (١٧ نمونه)، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (١٤ نمونه)، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (١٤ نمونه)*، *استافیلوکوکوس کپتیس (٥ نمونه)*، *استافیلوکوکوس هایکوس* (٥ نمونه) و *استافیلوکوکوس اینترمدیوس* (١ نمونه) جداسازی شده است (شکل ١). از برخی از نمونه ها بیش از یک گونه استافیلوکوکوس جداسازی شد.





نگاره ١: تصویر الکتروفورز محصولات PCR. ستون M : لدر ١٠٠ جفت بازی، ستون -: بلانک ، ستون مثبت کنترل مثبت و ستونهای ١ تا ٢٤ نمونه‌ها را نشان میدهند.

بررسی وجود ژن اورنیتین دکربوکسیلاز و لایزین دکربوکسیلاز در باکتری های جداسازی شده از نمونه های شیر نشان داد که تعداد ١٢ باکتری دارای ژنهای هدف بودند. تصویر ٢ نشان دهنده تعدادی از الکتروفورز محصولات PCR این ژن ها است.

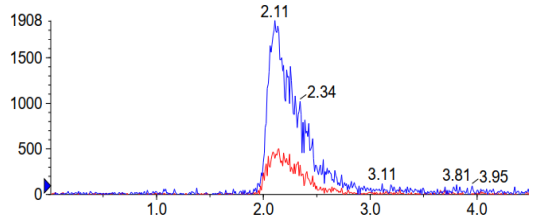


نگاره ٢: الکتروفورز محصولات PCR نمونه های ١ تا ٧، ستون اول نشانگر لدر ١٠٠ جفت بازی، ستون دوم کنترل مثبت و ستون سوم کنترل منفی را نشان میدهند. محصول ١٥٢ جفت بازی نشانگر محصول ژن اورنیتین دکربوکسیلاز و محصول ١٠٨ جفت بازی نشان دهنده تکثیر ژن لایزین دکربوکسیلاز است.

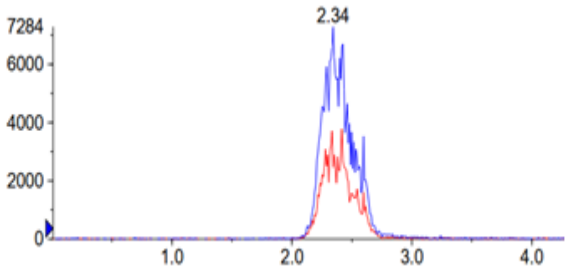
نتایج HPLC

نتایج نشان داد که در ٥٤ عدد از نمونه هایی که حاوی استافیلوکوکوس‌های دارای ژن اورنیتین دکربوکسیلاز یا لایزین دکربوکسیلاز بودند، مقادیری از پوترسین یا کاداورین جداسازی شد. همچنین مقادیر پوترسین و کاداورین در ٣ نمونه بیش از سایر نمونه ها بود. مقادیر پوترسین و کاداورین در روزهای دوم و سوم نسبت به روز اول به صورت معنی داری بیشتر بود ($p<0,001$). علاوه بر این در روز صفر تا ٢٤ ساعت پس از نمونه‌گیری پوترسین و یا کاداورین در نمونه ها مشاهده نشد. داده‌ها نشان داد که مقادیر پوترسین پس از ٤٨ ساعت در نمونه‌های ٤٤، ٥٠ و ٥٤ به ترتیب برابر با ٢١١، ٢٠٠ و ٢٠٠ ppb (part per

billion) بوده است. علاوه بر اینها مقادیر کاداورین پس از ۷۲ ساعت در نمونه‌های ٤٤، ٥٠ و ٥٤ به ترتیب برابر با ۲۳۰، ۲۱۰ و ۲۱۰ ppb بوده است (نمودار ۱و ۲).



نمودار ۱: کروماتوگرام آنالیز HPLC نمونه دارای بیشترین میزان پوترسین ٤٨ ساعت بعد از نمونه‌گیری.



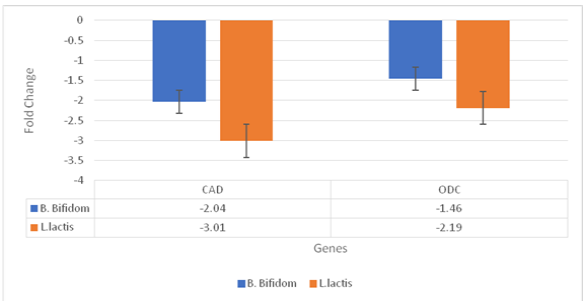
نمودار ۲: کروماتوگرام آنالیز HPLC نمونه دارای بیشترین میزان کاداورین ٤٨ ساعت بعد از نمونه‌گیری.

تیمار باکتری های تولید کننده آمین های بیوژن با CFS باکتری های پروبیوتیک

نتایج MIC به دست آمده برای باکتری های استافیلوکوکوس در معرض باکتری های پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* در نمونه های شماره ٥٤، ٤٠ و ٤٤ به ترتیب برابر با ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ٦٢/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین نتایج نشان داد که نتایج MIC به دست آمده برای باکتری های استافیلوکوکوس جداسازی شده از شیر در معرض باکتری های *پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم* در نمونه های شماره ٥٤، ٤٤ و ٤٠ به ترتیب برابر با ٦٢/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

نتایج بررسی بیان ژن

گرافهای بدست آمده از انجام PCR برای ٥ رقت از DNA این ژن، نمایانگر منحنی‌های استاندارد و قابل قبول برای این ژن بود. راندمان یا Efficiency واکنش PCR برای ژن هدف و *rpoB*، ۹۹/۹۹ محاسبه گردید. نتایج حاصل از آنالیز مقادیر CT بدست آمده از واکنش Real Time PCR با استفاده از نرم‌افزار REST 2018 نشان داد که مقدار Pvalue در زمینه مقایسه بیان ژن‌های هدف در ۳ نمونه از باکتری‌های استافیلوکوکوس تیمار شده و نشده با باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، برای ژن CAD کمتر از ۰,۰۰۲ بوده است که بیانگر کاهش معنی دار بیان ژن در اثر تیمار با بیفیدوباکتریوم بوده است. مقایسه تغییرات میزان Fold Change برای ژن CAD و ODC در دو گروه نشان داد که میزان کاهش بیان آن برابر با ۲,۰٤- و ۱,٤٦ - بوده است (p<۰,۰۱). علاوه بر این نتیجه t-test نشان داد که تیمار باکتری های مولد پوترسین و کاداورین با پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* موجب کاهش بیان ژنهای هدف شده است به طوری که میزان کاهش بیان آنها برابر با برابر با ۲,۱۹- و ۳,۰۱- بوده است که در هر دو مورد اختلاف بسیار معنی داری را نشان میدهد (p=0.001) (نمودار ۳).



نمودار ۳: نمودار نشان دهنده تغییرات Fold change در ژن های هدف در اثر تیمار با پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* نسبت به کنترل است.

بحث

استافیلوکوک ها دسته‌ای از باکتری های پر اهمیت مسئول در معضل مسمومیت های مواد غذایی هستند. این باکتری معمولا مسمومیت را به واسطه تولید متابولیت هایی متعددی از جمله توکسین‌ها و آمین‌ها اعمال می‌نماید (۱۲). شیر از مهمترین منابع تغذیه انسانی به شمار میرود و خطر عمده آلودگی شیر به استافیلوکوک‌ها آن است که می‌تواند با تولید آمین های بیوژن در بدن مصرف کننده ایجاد آلرژی نماید (۱۳). مطالعات نشان داده است که فقدان معیارهای مناسب بهداشتی در طی آماده سازی غذا، خطر بزرگی جهت آلودگی است و مسمومیت غذایی استافیلوکوکی که اغلب مرتبط با فرآورده های غذایی که به طور مستقیم توسط انسان دستکاری می شوند، علت مهمی از مسمومیت های غذایی در سرتاسر جهان به حساب آورده می‌شود (۱٤). این مطالعه بر آن بود تا با بررسی نمونه‌های شیر کارخانجات و دامداری‌ها، تاثیر پروبیوتیک های *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* را بر بیان ژنهای مولد پوترسین و کاداورین در استافیلوکوکوس‌های جدا شده از این نمونه‌ها با استفاده از روش های استاندارد بررسی نماید. داده های میکروسکوپی، بیوشیمیایی و مولکولی این مطالعه نشان داد که در ٦۰ درصد موارد باکتری‌های گونه استافیلوکوکوس از نمونه‌ها جداسازی گردید که شامل *استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس همولیتیکوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس هومینیس، استافیلوکوکوس هایکوس و استافیلوکوکوس اینترمدیوس* بود. در٥٤ عدد از نمونه هایی که حاوی استافیلوکوکوس‌های دارای ژن های هدف بودند، مقادیری از پوترسین یا کاداورین جداسازی شد. همچنین مقادیر پوترسین یا کاداورین در ۳ نمونه بیش از سایر نمونه ها بود. این مقادیر در روزهای دوم و سوم نسبت به روز اول به صورت معنی داری بیشتر بود ($p<۰,۰۰۱$). داده ها نشان داد که باکتری های پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در سطح معنی دار از نظر آماری موجب کاهش سطح بیان ژن‌های لایزین و اورنیتین *دکربوکسیلاز* دخیل در تولید آمین های بیوژن می‌شوند. در مطالعه ای که توسط مهتدی نیا و همکاران صورت گرفت محتوای آمین های بیوژن ٦۰ نمونه کنسرو تن ماهی عرضه شده در سوپرمارکت‌های شهر تبریز به روش الایزا ارزیابی شد تا به این آمین بیوژن به عنوان یک شاخص بهداشتی مهم نگریسته شود. نتایج نشان داد که میزان آمین های بیوژن در کنسروهای تن ماهی تولید شده مناطق جنوبی و شمالی کشور تفاوت آماری معنی‌داری داشت. کنسروهای تن ماهی تولید شده در تابستان و پاییز به ترتیب بیشترین و کمترین میزان آمین های بیوژن را دارا بودند. نهایتا نتیجه گیری آنها نشان داد که با توجه به اینکه درصد بالایی از کنسروها حاوی آمین های بیوژن بیش از حد مجاز بودند، خطر مسمومیت آمین های بیوژنی برای مصرف کنندگان این فرآورده‌ها وجود دارد (۱۵). در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که درصد قابل توجهی از نمونه‌ها حاوی باکتری های تولید کننده آمین های بیوژن بودند که موجبات تولید درصدهای مختلفی از پوترسین یا کاداورین را در نمونه فراهم مینمود. از سوی دیگر در مطالعه دیگری توسط شکرفروش و همکاران در سال ۲۰۱۸ روش الکتروفورز موئینه ای با آشکارساز جذبی (CZE) با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) برای اندازه گیری مقدار هیستامین در محیط کشت میکروبی مقایسه گردیده است(١٦). برای این منظور محیط کشت با سوش استاندارد مولد آمین های بیوژن *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* TYH1 و دو سوش *استافیلوکوکوس کپیتیس* و *استافیلوکوکوس کارنوسوس* دارای ژن هیستیدین دکربوکسیلاز تلقیح شد. مقدار آمین های بیوژن تولید شده توسط سه سوش باکتری اندازه گیری شده با دو روش مذکور تفاوت آماری معنی

داری نداشت. با توجه به یافته های مشابه دو روش، روش CZE به دلیل عدم نیاز به آماده سازی نمونه، سادگی، حساسیت و کم هزینه بودن، به عنوان روشی مناسب برای اندازه گیری مقدار آمین های بیوژن در محیط های کشت میکروبی پیشنهاد شد. در مطالعه دیگری توسط سید مهدی رضوی روحانی و همکاران (۱۳۹۲)، مقدار آمین های بیوژن پنیرهای کوپه در استان آذربایجان غربی با روش HPLC بررسی کردند(۱۷) ، در این مطالعه مقدار آمین های بیوژن پنیرهای کوپه به عنوان یکی از انواع پنیرهای سنتی پرطرفدار در استان آذربایجان غربی تهیه شده از شیر خام گوسفندی و برخی اوقات شیر خام گاو با استفاده از روش HPLC، اندازه گیری شد و نشان داد که کمترین مقدار آمین های بیوژن در پنیر کوپه ppm۲/٤۳ و بالاترین مقدار مشاهده شده در این نوع پنیر ۱۱۰۲/۲٤ ppm بود و در نهایت نشان دادند که اساس تولید آمین های بیوژن در پنیر و سایر فرآوردهای غذایی وجود و رشد میکروارگانیسم های دکربوکسیلاز مثبت در آنهاست. مطالعه حاضر در تایید مطالعات بالا نشان داده که روش HPLC روشی کارآمد در اندازه گیری آمین‌های بیوژن است و با توجه به در دسترس بودن و هزینه نه چندان بالا، دقت و صحت بالا میتواند به عنوان روش مرجع برای تعیین آلودگی‌های شیر به آمین‌های بیوژن و مواد دیگر سمی مورد استفاده قرار گیرد. مطلبی و همکاران در مطالعه دیگری اثبات نمودند که استفاده از عصاره علف مار همراه با بسته بندی با اتمسفر اصلاح شده موجب کاهش تولید آمین های بیوژن به خصوص کاداورین و پوترسین در فیله ماهی قزل آلای رنگین کمان میشود و ماندگاری آن را بیشتر می کند. آنها اعلام کردند اثرات این عصاره از طریق خاصیت های ضد میکروبی آن اعمال میگردد که منطبق بر یافته های مطالعه حاضر است (۱۸). در سال ۲۰۱۷ Septiana و همکاران در طی مطالعه ای اثبات نمودند که میکروارگانیسم های اندوفیتیک همراه با زردچوبه *(Curcuma longa L)* می توانند باکتری‌های تولیدکننده آمین های بیوژن در ماهی را مهار کنند (۱۹). این بررسی نشان داد گونه های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* پروبیوتیک هایی هستند که در مهار باکتری استافیلوکوکوس موثرند. در مطالعه حاضر نیز داده‌ها نشان داد که CFS باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* دارای توانایی مهار رشد و جلوگیری از تولید آمین های بیوژن از طریق مهار بیان ژنهای دخیل آن در باکتری های استافیلوکوکوس جداسازی شده از شیر است. در نهایت داده های این مطالعه نشان میدهد که از آنجا که ترکیب باکتریولوژیک شیر از اهمیت خاصی برخوردار است، هر نوع تغییر در ترکیب مزبور و بر همین اساس وجود مقادیر بالای آمین های بیوژن میتواند دلالت بر نبود کیفیت بهداشتی شیر مورد استفاده باشد. بنابراین ارائه راهکارهایی به منظور کاهش جمعیت این دسته از باکتری‌ها در کاهش مقدار آمین های بیوژن نیز موثر خواهد بود. این مطالعه نشان داد که استفاده از باکتری های پروبیوتیک میتواند از طریق کاهش بیان ژن مولد پوترسین و کاداورین، منجر به کاهش تولید این آمین های مضر گردد.

فهرست منابع

1. 1. Renes E, Ladero V, Tornadijo M, Fresno JM. Production of sheep milk cheese with high γ-aminobutyric acid and ornithine concentration and with reduced biogenic amines level using autochthonous lactic acid bacteria strains. Food microbiology. 2019;78:1-10.
2. Hanrahan L, McHugh N, Hennessy T, Moran B, Kearney R, Wallace M, et al. Factors associated with profitability in pasture-based systems of milk production. Journal of Dairy Science. 2018;101(6):5474-85.
3. Costa MP, Rodrigues BL, Frasao BS, Conte-Junior CA. Biogenic amines as food quality index and chemical risk for human

consumption. Food quality: Balancing health and disease: Elsevier; 2018. p. 75-108.
4. Beatrice T, Francesca P, Barbara T, Filippo F, Roberta N. Qualitative and quantitative evaluation of biogenic amines in vitro production by bacteria isolated from ewes' milk cheeses. European Food Research and Technology. 2018;244(4):721-8.
5. Ruiz-Capillas C, Herrero AM. Impact of biogenic amines on food quality and safety. Foods. 2019;8(2):62.
6. Benkerroum N. Biogenic amines in dairy products: origin, incidence, and control means. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2016;15(4):801-26.
7. Spizzirri UG, Puoci F, Iemma F, Restuccia D. Biogenic amines profile and concentration in commercial milks for infants and young children. Food Additives & Contaminants: Part A. 2019;36(3):337-49.
8. Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. Journal of food science and technology. 2015;52(12):7577-87.
9. Kerry RG, Patra JK, Gouda S, Park Y, Shin H-S, Das G. Benefaction of probiotics for human health: A review. Journal of food and drug analysis. 2018;26(3):927-39.
10. Hokmollahi F, Ehsani M. Characteristics of Nodooshan Goat Milk and Identification of Volatile Compounds in Traditional Nodooshan Goat Cheese during Ripening. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2020;14(4):67-76.
11. Aminnezhad S, Kasra-Kermanshahi R. Antibiofilm activity of cell-free supernatant from Lactobacillus casei in Pseudomonas aeruginosa. Feyz Journal of Kashan University of Medical Sciences. 2014;18(1).
12. Sun Q, Chen Q, Li F, Zheng D, Kong B. Biogenic amine inhibition and quality protection of Harbin dry sausages by inoculation with Staphylococcus xylosus and Lactobacillus plantarum. Food Control. 2016;68:358-66.
13. Guo J, Luo W, Fan J, Suyama T, Zhang W-x. Co-inoculation of Staphylococcus piscifermentans and salt-tolerant yeasts inhibited biogenic amines formation during soy sauce fermentation. Food Research International. 2020:109436.
14. Rubab M, Shahbaz HM, Olaimat AN, Oh D-H. Biosensors for rapid and sensitive detection of Staphylococcus aureus in food. Biosensors and Bioelectronics. 2018;105:49-57.
15. Mohtadi nia J, Zakerzadeh M, Goudarzi M, Rahman pour H, Khadem Haghighian H. Determining the Amount of Histamine Levels in Canned Tuna Fish Marketed in Supermarkets of Tabriz City. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2014;4(2):201-8.
16. Shekarforoush S, Aminlari M, Hosseinzadeh S. Comparison of capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the determination of histamine in bacterial culture media. 2018.
17. Razavi RS, Hassanzadazar H, Aliakbarlu J. Histamine determination in koopeh cheese in west-azerbaijan province by HPLC. 2013.
18. Motalebi A, Razavilar V, Khadem P. Biogenic amines production in Rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) treated by Caper (Capparis spinosa) extract. 2019.
19. Septiana E, Sukarno N, Simanjuntak P. Endophytic Fungi Associated With Turmeric (Curcuma longa L.) Can Inhibit Histamine-Forming Bacteria in Fish. HAYATI Journal of Biosciences. 2017;24(1):46-52.