فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۲۲، جلد ۶، شماره ۳، تابستان۹۲ صفحه ۷۵ تا ۸۰

شناسایی باسیلوس سرئوس ها ی انتروتوکسی ژنیک در غذا های گوشتی آماده در شهر زنجان

زهرا دیلمی خیابانی[۱]، غزاله شمس المعالی[۲]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، استادیار دانشکده علوم پایه و پزشکی، زنجان.ایران. Zdeilami@yahoo.com
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، دانشکده علوم پایه و پزشکی کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، زنجان.ایران.
تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۹ تاریخ پذیرش:۹۲/۵/۱۵

چکیده
زمینه وهدف: بسیاری از سویه‌های باسیلوس سرئوس باعث مسمومیت غذایی از نوع اسهالی و استفراغی می‌شوند. بیماری‌های نوع اسهالی توسط انتروتوکسین‌های همولیزین HBL، غیرهمولیتیک NHE و سیتوتوکسین K ایجاد می‌گردد. از آنجا که مصرف غذاهای گوشتی آماده در کشورهای درحال توسعه هم‌چون ایران رو به افزایش می باشد و نیز گزارش دقیقی در رابطه با میزان آلودگی این باکتری در دسترس نمی باشد، هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی باسیلوس سرئوس های انترو توکسی ژنیک و بررسی شیوع آن است.
روش کار: در این مطالعه وجود باسیلوس سرئوس در ۸۰ نمونه‌ی مواد گوشتی مختلف (سوسیس، کالباس، همبرگر و کباب های آماده) خریداری شده از فروشگاه‌ها در شهر زنجان مورد آزمایش قرار گرفت. جداسازی باسیلوس سرئوس با استفاده از محیط کشت اختصاصی استفاده از محیط کشت انتخابی (پلی‌میکسین، زرده‌ی تخم‌مرغ، مانیتول، فنل‌رد آگار) انجام گردید. آزمون‌های تاییدی بیوشیمیایی و به دنبال آن تایید مولکولی باسیلوس سرئوس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. نمونه‌های مثبت باسیلوس سرئوس جهت بررسی ژن های کمپلکسNH مورد آزمایش قرار گرفتند.
یافته ها: از ۸۰ نمونه مورد بررسی ۳۲ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس بودند و در بین این تعداد، باسیلوس سرئوس های جدا شده از ۱٤ نمونه حاوی ژن های کمپلکس NHE بودند.
نتیجه گیری: استفاده از تکنیک و روش سریع برای تشخیص حضور باسیلوس سرئوس انتروتوکسی ژنیک در غذا از اهمیت زیادی برخودار است تا از سلامتی غذای مصرفی اطمینان حاصل شود.
واژه های کلیدی: باسیلوس سرئوس، مواد گوشتی ، ژن های کمپلکس NHE، PCR.

مقدمه
با سیلوس سرئوس یکی از مهم‌ترین باکتری های عامل مسمومیت غذایی و تخریب بسیاری از مواد غذایی می باشد. باسیلوس سرئوس یک باکتری اسپورزا می‌باشد و خطر انتقال آن در غذاهای تیمار شده با حرارت و و فرآوری شده وجود دارد. برخی از ایزوله های باسیلوس سرئوس در دمای یخچال نیز قابل رشد هستند و اسپور آن‌ها در دماهای بالاتر نیز دوام می‌آورد(۸، ۷، ۶، ۳). این باکتری از مهم‌ترین بیماری‌زاهای مواد غذایی مختلف هم‌چون لبنیات، غلات، برنج و نیز مواد گوشتی می باشد. دو نوع مختلف مسمومیت غذایی یعنی نوع اسهالی و استفراغی توسط باسیلوس سرئوس ایجاد می شود که در آن به ترتیب ژن های کمپلکس NHE و HBL نقش دارند(۱۶، ۱۴، ۱۲، ۱۱، ۱۰، ۴). کمپلکس NHE از سه جزء A، B و C تشکیل شده است و هر سه جزء برای حداکثر فعالیت NHE مورد نیاز می باشند. توکسین NHE برای اولین بار در یک مسمومیت غذایی در نروژ جداسازی گردیده است(۱۵). در سال ۲۰۰۷ Das و همکارانش در هند روابط بین تولید انتروتوکسین اسهالی و حضور ژن‌های ویرولانت متفاوت در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از غذاهای دریایی بررسی کردند.

همه‌ی ایزوله‌های تولید کننده‌ی انتروتوکسین اسهالی حضور ژن های کمپلکس NHE را نشان می‌دهند در حالی که ایزوله‌های غیر انتروتوکسی ژنیک فاقد این ژن-ها بودند(۴). مطالعات ویجنادز در سال ۲۰۰۶ بر روی چندین ماده غذایی نشان داد که ژن‌های HBL در۶۶٪ نمونه ها وجو دارد(۱۹). در مطالعه ای که توسط شارما در سال ۲۰۰۳ بر روی محصولات گوشتی انجام گرفت نشان داد که شیوع باسیلوس سرئوس در فرآورده های گوشتی بیشتر از گوشت خام می باشد(۱۷). شناسایی سلامتی نوع غذای مصرفی و تعیین نوع مسمومیت غذایی با استفاده از این مجموعه ی ژن ها حائز اهمیت می باشد(۹، ۵). در طول دهه گذشته وقوع بیماری های میکروبی ناشی از مواد غذایی در کشورهای در حال توسعه رو به افزایش بوده است و این در حالی است که وقوع عفونت ها و مسمومیت های غذایی اغلب گزارش نشده باقی مانده و لذا تعیین آمار دقیق از میزان ابتلا خصوصاً در کشورهای در حال توسعه هم‌چون ایران امکان پذیر نمی باشد. با در نظر گیری این مطلب که استفاده از مواد گوشتی آماده روز به روز در حال افزایش می باشد هدف از این پژوهش شناسایی و جداسازی باسیلوس سرئوس های انترو توکسی ژنیک و بررسی شیوع آن است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه های گوشتی و جداسازی باسیلوس سرئوس

۸۰ نمونه غذای گوشتی آماده شامل انواع سوسیس، کالباس ، همبرگر و کباب آماده از مغازه های مختلف زنجان خریداری گردید. ۲۵ گرم از هر نمونه در ۲۲۵ میلی لیتر نر مال سالین قرارداده سپس در مخلوط کن حل و پس از چند بار شیک کردن رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} از نمونه ها تهیه گردید(۴،۳). از رقت‌های تهیه شده ۱ میلی‌لیتر در لوله‌های حاوی محیط BHI مایع (محیط غنی کننده) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه‌ی سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در محیط BHI، یک لوپ از محیط حاوی باکتری برداشته و روی محیط PEMPA Pyruvate-Egg Yolk ManitolBromocresol Purple Agar) (Polymixin-، کشت داده و در انکوباتور ۳۷ درجه-سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمادهی شدند(۵، ۲). بعد از این مدت کلنی‌های صورتی دارای هاله‌ی لسیتیناز(Lecithinase) به محیط نوترینت آگار منتقل و رنگ آمیزی گرم و اسپور و آزمایشات بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز، تحرک، vp، احیاء نیترات، آمیلاز(هیدرولیز نشاسته) و همولیز بتا انجام گردید(۴،۱).

استخراج DNA برای واکنش PCR

استخراج DNA از باسیلوس سرئوس با استفاده از روش انجماد و جوش انجام گرفت. در این روش ابتدا باکتری-ها در محیط نوترینت آگار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت کشت شدند. به اندازه‌ی ۱ لوپ از کلنی برداشته و در ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده معلق کرده، سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد سپس به مدت ۱۰ دقیقه در در داخل آب جوش۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از این مدت ۱۰ ثانیه دردور rpm ۱۱۰۰۰سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی DNAبوده و به میکروتیوب های جدید انتقال گردید(۴،۱).

واکنش های PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی باسیلوس سرئوس

پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی و مشخص شدن کلنی‌های باسیلوس سرئوس، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی گروه باسیلوس سرئوس جهت تایید کلنی آن-ها PCR برای ۸۰ نمونه انجام گرفت(جدول ۱)(۲۰، ۱۸، ۱۳).

جدول۱- پرایمرهای اختصاصی گروه باسیلوس سرئوس جهت تایید کلنی آن‌ها PCR

B. cereus group	5'- TGCAACTGTATTAGCACAAGC T -3'	*BalF*
	5'- TACCACGAAGTTTGTTCACTACT -3'	*BalR*

برای انجام واکنش PCR مخلوط واکنش شامل بافر PCR (۵ میلی مول KCl، Tris-HCl ۱ میلی مول)، ۱/۵ میلی مول$MgCL_2$ ، ۲/۵ میلی مول dNTP، پرایمر رفت ۱۰ پیکومول، پرایمر برگشت ۱۰ پیکومول، آنزیم Taq پلیمراز ۵ واحد در میکرولیتر، DNA (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر تهیه شد. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به رشته های الگو در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، بسط رشته DNA توسط پلیمراز در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار گردید و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد برای واکنش ها اتمام یافت و محصول PCR روی ژل آگارز۱ درصد بررسی شد(۴).

واکنش های PCR با استفاده از پرایمرهای ژن های کمپلکس NHE(*nheC،nheB،nheA*) باسیلوس سرئوس

جهت انجام این واکنش پس از استخراج از نمونه ها به روش فریز- جوش ازپرایمرهای ژن های *nheC،nheB،nheA* استفاده کردیم که این پرایمرها عبارتند از:

nheA–S ***nheA*** F-
ATTAAGGTAAATGCGATGAG
nheA-A R-
GCTTCAGTTTGTGATAACTT
nheB–S ***nheB*** F-
CTATCAGCACTTATGGCAG
nheB–A R-
ACTCCTAGCGGTGTTCC
nheC–S ***nheC*** F-
CGGTAATGATTGCTGGG
nheC–A R-
CAGCATTCGTACTTGCCAA

مخلوط واکنش PCR با پرایمر های فوق و مطابق با موارد گفته شده برای پرایمرهای اختصاصی باسیلوس سرئوس، تهیه گردید. برنامه دمایی دستگاه ترمال سایکلر شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمر به رشته های الگو در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، بسط رشته DNA توسط پلیمراز در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه که سه مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار شد و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد برای واکنش ها اتمام یافت و محصول PCR روی ژل آگارز۱ درصد بررسی شد (۲۰، ۱۸، ۱۳).

نتایج

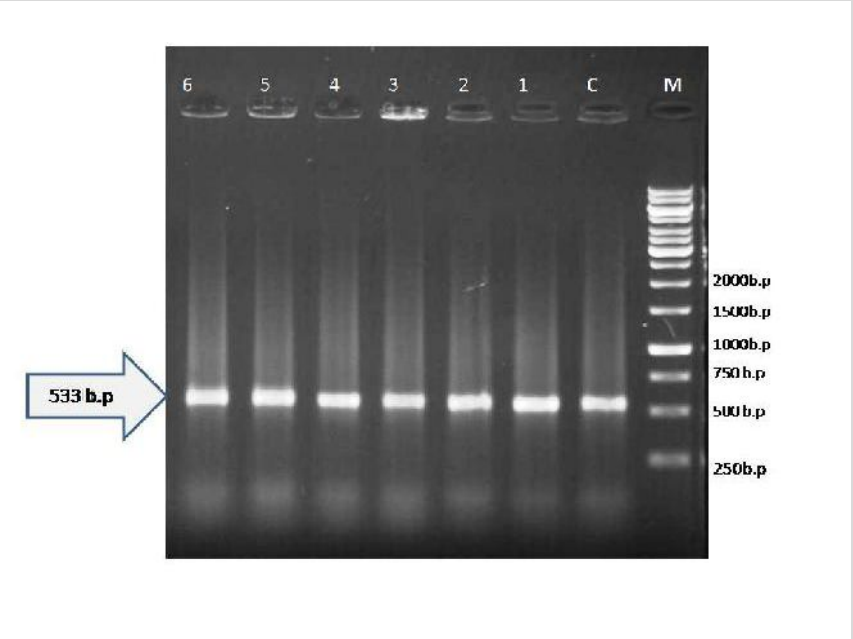
نتایج مربوط به جداسازی باسیلوس سرئوس

بعد از کشت نمونه‌های روی محیط PEMPA، کلنی-هایی به رنگ صورتی و با هاله‌ی رسوبی لسیتیناز روی این محیط رشد نمودند. کلنی‌های صورتی با هاله‌ی لسیتیناز به محیط کشت نوترینت آگار منتقل شدند تا برای جداسازی دقیق‌تر مورد تست‌های بیوشیمیایی اشاره شده در بخش مواد و روش ها قرار گیرند.

نتایج مربوط به واکنش PCR با پرایمر های اختصاصی جهت تایید کلنی های باسیلوس سرئوس

بر روی DNAهای استخراج شده، با استفاده از پرایمر اختصاصی باسیلوس سرئوس واکنش‌های PCR انجام گرفت. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد مطالعه شدند. تمام ایزوله های تایید شده در روش بیوشیمیایی قطعه ۵۳۳ جفت بازی را نشان دادند. شکل ۱ نمونه ای از الکتروفورز باسیلوس سرئوس های جدا شده از نمونه ها گوشتی را با استفاده از پرایمر های اختصاصی

نشان می دهد. از ۸۰ نمونه مورد مطالعه ۳۲ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس بودند. کنترل مثبت استفاده شده در این مطالعه، مربوط به باسیلوس سرئوس انتروتوکسی ژنیک می باشد که در آزمایشگاه جداسازی شده و حضور ژن های کمپلکس NHE و HBL در آن تایید شده است.



شکل۱- الکتروفورز باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از نمونه‌ها (٦-١) چند تا از نمونه‌های گوشتی مورد مطالعه که با پرایمرهای اختصاصی باسیلوس سرئوس باند ۵۳۳جفت باز را نشان دادند. M: مارکر kb ۱. C: کنترل مثبت.

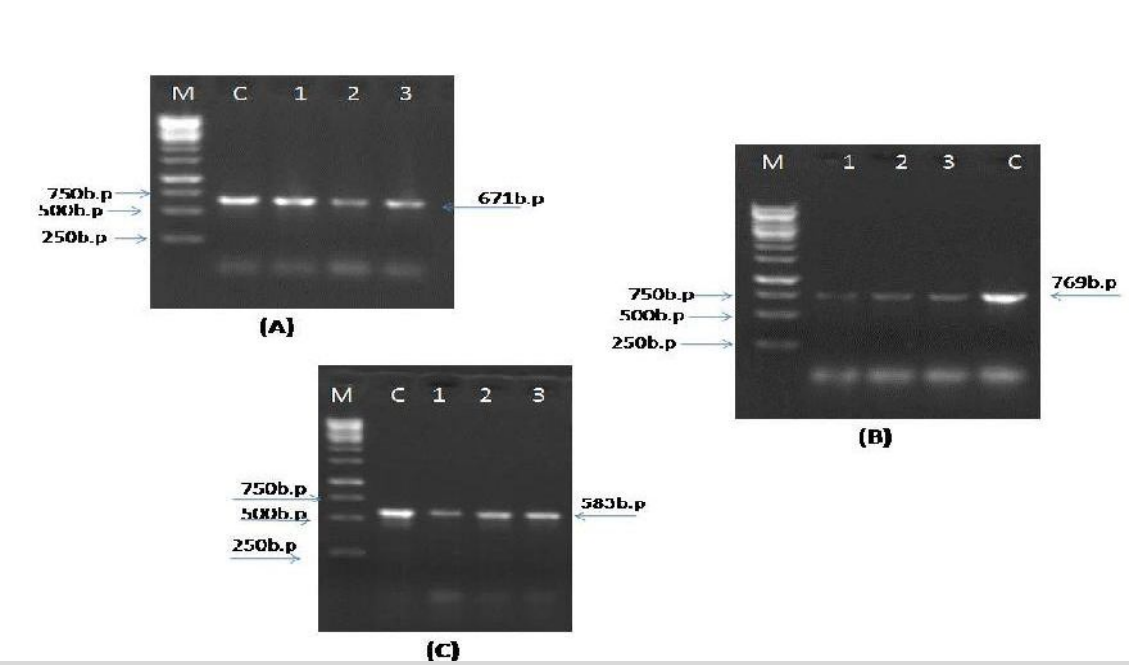
PCR با پرایمر های اختصاصی کمپلکس NHE

در این مرحله باسیلوس سرئوس های جدا شده، با پرایمر های ژن های *nheA* ، *nheB* و *nheC* و روش PCR بررسی شدند. از ۳۲ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس ۱۴ نمونه کمپلکس NHE شامل *nheA* با ۶۷۱، جفت باز *nheB* با ۷۶۹ و جفت باز *nheC* با۵۸۳ جفت باز نشان دادند (شکل ۲).

بحث و نتیجه گیری

امروزه استفاده از غذا های گوشتی آماده رو به افزایش است. در کشورهای در حال توسعه مثل ایران تمایل مردم به استفاده این نوع غذاها بالاست ولی تاکنون مطالعه دقیقی در زمینه شناسایی شیوع باکتری های عامل مسمومیت غذایی از طریق این نوع فرآورده های گوشتی صورت نگرفته است و در نتیجه آمار دقیقی از میزان شیوع باکتری های مسمومیت زا در دسترس نمی باشد. هدف از این تحقیق شناسایی حضور باسیلوس سرئوس های انتروتوکسی ژنیک در غذاهای گوشتی آماده عرضه شده در فروشگاه های شهر زنجان بود که با استفاده از روش PCR باسیلوس سرئوس های انتروتوکسی ژنیک از غیر انتروتوکسی ژنیک تفکیک شدند. نتایج ما نشان داد که ۴۰ درصد نمونه ها آلوده به باسیلوس سرئوس بودند و ۳۵ درصد نمونه ها ژن های کمپلکس NHE را نشان دادند. در مطالعه ای که Das و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی غذا های گوشتی دریایی در هند انجام دادند، آلودگی ۲۹/۴ درصدی را گزارش نمودند(۴). در مطالعه حاضر با پرایمر های اختصاصی باسیلوس سرئوس قطعه ۵۳۳ جفت بازی را در تمام باسیلوس سرئوس های تایید شده با روش های بیو شیمیایی مشاهده کردیم که Das و

همکاران نیز این قطعه را درتمام باسیلوس سرئوس ایزوله شده از غذاهای گوشتی دریایی گزارش کردند(۴). در مطالعه دیگر که در سال ۲۰۰۷ در کشور چین انجام شد باسیلوس سرئوس در ۵۴ نمونه شیر پاستوریزه وجود داشت که در این میان ۷۱/۱ درصد نسبت به ژن *nheA* ۶۲ درصد نسبت به ژن *nheB* و ۷۱/۷ درصد نسبت به ژن *nheC* مثبت بودند(۲). در سال ۲۰۰۹ مطالعه ای که در آمریکا انجام گرفت و ۸۳ باسیلوس سرئوس را از ۹۴ نمونه نمونه برنج جدا کردند که مشخص شد حدود ۸۹ درصد از باسیلوس سرئوس های جدا شده دارای کمپلکس NHE بودند(۱). در مطالعه ما تمام جدایه های حاوی کمپلکس NHE دارای خاصیت هیدرولیز نشاسته بودند. این خاصیت در مطالعه داس(Das) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز مشاهده شده است. همچنین گاروال (Garwal) و همکاران رابطه بین هیدرولیز نشاسته و خاصیت انتروتوکسی ژنیک را در باسیلوس سرئوس های جدا شده از شیر، برنج، ماهی و فراورده های گوشتی گزارش نموده است(۴).



شکل ۲- کمپلکس NHE شامل(A) *nheA* با جفت باز ۶۷۱، (B) *nheB* با ۷۶۹ جفت باز و (C) *nheC* با۵۸۳ جفت باز. M: مارکر kb ۱. C: کنترل مثبت.

روش سریع برای تشخیص حضور باسیلوس سرئوس انتروتوکسی‌ژنیک در غذا از اهمیت زیادی برخوردار است تا از سلامتی غذای مصرفی اطمینان حاصل شود(۵). روش مرسوم در تفکیک سویه‌های باسیلوس سرئوس انتروتوکسی‌ژنیک و غیرانتروتوکسی‌ژنیک تست RPLA است که مدت زمان طولانی در نشان دادن نتایج لازم دارد(۴). اما PCR روش سریع و قابل اطمینان برای تشخیص حضور ارگانیسم‌های مخصوص می‌باشد روش PCR بر اساس ژن‌های کمپلکس NHEسریع‌تر از کیت-های آزمایشی برای تشخیص انتروتوکسین عامل اسهال نتیجه می‌دهد.

منابع

1. Ankolekar, Ch., Rahmati, T., Labbé, R. G. (2009). Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S rice. International Journal of Food Microbiology, 128; 460–466.

2. Bjarne M. H., Niels, B. H. (2001). Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. Applied and Environmental Microbiology, 185-189.

3. Chang, Y.H., Shangkuan, Y.H., Lin, H.Ch., Liu, H.W. (2003). PCR assay of the *groEL* gene for detection and differentiation of *Bacillus Cereus* group cells. Appiled an Environmental Microbiology, 69(8); 4502-4510.

4. Das. S., Surendran. P. K., Thampuran. N. (2009). PCR-based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Indian. J. Med. Res., 129; 316-320.

5. Elzbieta O.-W., Walczak, P., Modrak, R. (2006). Detection of entrotoxic *Bacillus cereus* producing hemolytic and non hemolytic enterotoxins by PCR test. Polish Journal of Microbiology, 55(2); 113-118.

6. Finlay, W. J. J., Logan, N. A., Utherland, A. D. (2002). *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. Food Microbiology, 19; 431-439.

7. Floristean, V., Camen, C., Carp, C. M. (2007). bacteriological characteristics of *Bacillus Cereus* isolates from poultry. Bulletin USAMV-CN, 64;1-2.

8. Gitahi, N. J., Ombui. J. N., Nduati. D. W., Gicheru. M. M. (2009). genetis characterisation of food borne *Bacillus cereus* strains from, milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. International Journal of Integrative Biology, 5(2); 82-86.

9. Guven, K., Mutlu, M.B., Avci, O. (2006). Incidence and characterization of *Bacillus Cereus* in meat and meat products consumed in Turkey. Journal of Food Safety, 26; 30-40.

10. Haque A, Russell, N.J. (2005).Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. International Journal of Food Microbiology, 98; 23-34.

11. Lund. T, Granum. P. E. (1996). Characterisation of a non–haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a food borne outbreak, FEMS Microbiol. Lett, 141; 151–156.

12. Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland. M. S., Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiology, 150; 3959–3967.

13.LM, W., Dufrenne, J. B., van Leusden, F.M. (2002). Characterization of *Bacillus cereus*. RIVM Report, 2509-12002.

14. Mantynen, V., Lindstrom, K. (1998). A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 64(5); 1634–1639.

15. Peng, H., Ford, V., Frampton, E. W., Restaino, L., Shelef, L. A., Spitz, H. (2001). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. Food Microbiology, 18; 231-238.

16. Sarrias, J. A., Valero, M., Salmeron, M. C. (2002). Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. Food Microbiology, 19; 589-595.

17. Sharma,C.S., Sharma, D. K., Gill, J.P.S., Aulakh, R.S. (2003). *Bacillus cereus* from foods in India and its of animal origin in public health significance. ActaVet. Scandinavia, 44(1); 118.

18. Toril Lindba, C.k., Annette Fager, L., Skeie Rodland, M., Granum, P. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. Microbiology 150; 3959-3967.

19. Vilas-boas, G.T., Peruca, A.P.S., Arantes, O.M.N. (2007). Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthrasis* ,and *Bacillus thuringiensis* . J Microbiol, 53; 673-687.

20 Wijnands, LM., Dufrenne, JB., Rombouts, FM. (2006). Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cerus* in food commodities in the Nethelands. J. Food Prot, 69, 2587-2594.