

شناسایی *Bacillus cereus* انتروتوكسینیک از غیر انتروتوكسینیک در ماهی PCR با استفاده از روش *Schizothorax zarudnyi*

Detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from non-enterotoxigenic in *Schizothorax zarudnyi* by PCR

نرگس آهنی^۱، مجید علیپور اسکنданی^{*۱}

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه زابل

Narges Ahani¹, Majid Alipour Eskandani *¹

1. MSC Student and Assistant Professor, University of Zabol, Zabol, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: nargesahani@hotmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۵)

چکیده

طیعت انتشار دارد. بسیاری از سویه های این باکتری، باعث مسمومیت غذایی با عالیم اسهال و استفراغ می شوند. PCR یک روش دقیق و سریع و اختصاصی برای شناسایی *Bacillus cereus* انتروتوكسینیک در مواد غذایی است، تا مطمئن شویم که مواد غذایی سالم و قابل مصرف می باشند. در مطالعه حاضر تعداد ۳۵ نمونه ماهی است، تا دریاچه چاه نیمه تهیه شد. از هر کدام از نمونه های ماهی با استفاده از محیط *Schizothorax zarudnyi* از دریاچه چاه نیمه تهیه شد. توانایی تولید انتروتوكسین در ۱۳ ایزوله بدست آمده کشت انتخابی PEMPA با سیلوس سرئوس جداسازی شد. توانایی تولید انتروتوكسین در ۱۳ ایزوله بدست آمده از نمونه های تایید شده از نظر *RPLA* با آزمون *Bacillus cereus* مورد بررسی قرار گرفت و حضور ژن *hblA* با روش PCR ارزیابی شد که *Bacillus cereus* و با سیلوس سرئوس انتروتوكسینیک به ترتیب در ۳۷/۲ و ۲۵/۸ رصد از نمونه های ماهی شیزوتوراکس زارودنی یافت شد. در این مطالعه همه ایزوله های انتروتوكسینیک دارای ژن *hblA* بودند و در هیچکدام از ایزوله های غیر انتروتوكسینیک ژن *hblA* یافت نشد. یافته ها نشان داد که واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) اختصاصی ژن *hblA* می تواند برای تمایز کردن ایزوله های با سیلوس سرئوس انتروتوكسینیک از ایزوله های با سیلوس سرئوس غیر انتروتوكسینیک به کار رود و روش جایگزین مناسبی برای *RPLA* می باشد و قادر است در مدت زمان کوتاه تری و با هزینه کمتری ایزوله های با سیلوس سرئوس انتروتوكسینیک را از ایزوله های با سیلوس سرئوس غیر انتروتوكسینیک تمایز کند.

واژه های کلیدی

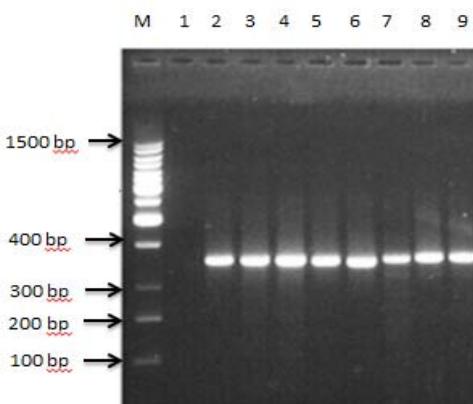
انتروتوكسین
ژن *hblA*
Bacillus cereus
PCR
Schizothorax zarudnyi

در مطالعه حاضر ۳۵ ماهی *Schizothorax zarudnyi*, که در زبان محلی به آن ماهی خواجه می‌گویند و این گونه در جهان مخصوص منطقه سیستان است، از دریاچه چاه نیمه شماره یک واقع در فاصله ۵۰ کیلومتری شهرستان زابل تهیه شد و وجود باسیلوس سرئوس در این ۳۵ نمونه ماهی بررسی و ژن تولید کننده انتروتوكسین همولیتیک در جدایه‌های مختلف باسیلوس سرئوس‌های جدا شده ارزیابی شد. برای این مطالعه از gene specific PCR و روش *hblA* استفاده شد. علاوه بر ایزوله‌های *Bacillus cereus* از *Bacillus subtilis* به عنوان سویه استاندارد استفاده شد. آزمایش‌ها در آزمایشگاه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل انجام شد. جداسازی باسیلوس سرئوس به وسیله محیط کشت polymixin- pyruvate- egg yolk- manitol- انتخابی صورت گرفت. ۲۵ گرم از bromocresol purple agar (PEMPA) هر نمونه عضله ماهی در ۲۲۵ میلی لیتر نرمال سالین در شرایط کاملاً استریل در stomacher هموژن شد. ۰/۵ میلی لیتر از هر نمونه روی محیط PEMPA کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از این مدت کلونی‌های صورتی دارای هاله لسیتیناز (Lecithinase) به محیط نوترینت آگار منتقل شدند و رنگ‌آمیزی گرم و اسپور و همچنین آزمایش‌های بیوشیمیابی شامل آزمون‌های کاتالاز، تحرک، احیای نیترات، آمیلاز (هیدرولیز نشاسته) و همولیز بتا (محیط آگار حاوی خون گوسفندی) انجام و برای اطمینان، سه بار تکرار شد Valero et al. 2007). توانایی تولید انتروتوكسین با روش Reverse Passive Latex Agglutination (RPLA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان دادن مداوم با دور ۱۵۰rpm انکوبه شد. سپس این محیط در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۴۰۰۰ سانتی‌فورم شد. مایع رویی که بدون سلول است برای تشخیص انتروتوكسین با آزمایش RPLA توسط کیت BCET-RPLA مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت همولیتیک نیز با استفاده از محیط آگار حاوی ۵ درصد خون گوسفند هم با کشت در سطح (Ngamwongsatit et al. 2008) و هم کشت در عمق بررسی شد.

باکتری گرم مثبت، هوایی اختیاری و از خانواده *Bacillus cereus* Bacillaceae است. این باکتری متحرک، از نظر واکنش همولیتیک مثبت، کاتالاز مثبت، مقاوم به پنی سیلین و فاقد رشد به شکل ریزوئید است. دمای مناسب رشد این باکتری ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است ولی تا دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد و در دمای پایین‌تر از ۷ درجه سانتی‌گراد نیز قادر به رشد است (Valero et al. 2007; Tallent et al. 2012) *Bacillus cereus* دو سندروم سمومیت غذایی است یکی از سندروم‌های ناشی از این باکتری، شامل تهوع و استفراغ با دوره نهفتگی یک تا ۶ ساعته است و به سندروم استفراغی با دوره کمون کوتاه موسوم است که با علائمی نظیر استفراغ (صددرصد)، کرامپ شکمی (صددرصد) و اسهال (۳۰ درصد) تظاهر می‌نماید. سندروم دیگر ناشی از این باکتری، شامل کرامپ‌های شکمی همراه با اسهال و دوره کمون ۸ تا ۱۶ ساعته است که به سندروم اسهالی با دوره کمون طولانی موسوم می‌باشد، که با علائمی نظیر اسهال (۹۶ درصد)، کرامپ شکمی (۷۵ درصد)، استفراغ (۳۰ درصد) و تب (به ندرت) تظاهر می‌نماید (Phelps and McKillip 2002; Banerjee et al. 2011) (hemolysin BL (HBL)) BL سندروم اسهالی به واسطه همولیزین (non-Beecher et al. 1995) (Lund et al. 1996) hemolytic enterotoxin (NHE) (Lund et al. 2000) (cytotoxin K) (Lund et al. 2000) (cytotoxin K) binding protein BL تشکیل شده است از (Heinrichs et al. 1993) کیلودالتون) که به وسیله ژن *hblA* کد می‌شود. ۳۶ کیلودالتون) که به ترتیب توسط ژن‌های *hblC* و *hblD* کد می‌شوند (Ryan et al. 1997). حداکثر بیان فعالیت HBL نیازمند هر ۳ جز پروتئینی می‌باشد. انتروتوكسین غیرهمولیتیک، ۳ جز پروتئینی L1 و L2 را دارد که همه آنها برای حداکثر فعالیت سیتوتوکسیک مورد نیاز می‌باشند. این ۳ پروتئین به ترتیب توسط ۳ ژن *nheC* و *nheB* کد می‌شوند (Lund and Granum 2004) *nheA* کد می‌شوند (Lindback et al. 2004) سیتوتوکسین K (CytK) (Bacillus) باسیلوس سرئوس به دلیل دارا بودن فعالیت همولیتیک و سیتوتوکسیک، (Lund et al. 2000) یک فاکتور مهم در شیوع سمومیت غذایی است.

.2000)

شدند. سپس تکثیر قطعه مورد نظر زیر نور ماورای بنسن مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر از *Bacillus subtilis* ATCC 6633 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از ۳۵ نمونه ماهی ۳۷/۲ (۱۳ نمونه از شیزوتوکسین زارودنی تهیه شده از دریاچه چاه نیمه، ۲۵/۸ درصد) نمونه از نظر باسیلوس سرئوس مثبت بودند و ۹ (۹ نمونه) تا از آنها باسیلوس سرئوس انتروتوکسینیک بودند یعنی ۳۷۲ جفت بازی که با آغازگرهای اختصاصی ۹ تا از آنها محصول ۳۷۲ جفت بازی که با آغازگرهای اختصاصی برای انتروتوکسین باسیلوس سرئوس تکثیر شده بود را نشان دادند (جدول ۳). سویه استاندارد باسیلوس سرئوس ATCC 14579 نیز هم با آزمایش RPLA و هم با PCR ژن *hblA* انتروتوکسینیک بود. به عبارت دیگر تمامی ایزوله‌های غیر انتروتوکسینیک در PCR ژن *hblA* هیچ باندی ندادند. ۱۳ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس از نظر تولید انتروتوکسین اسهالی با تکنیک RPLA بررسی شدند که ۹ تا از نمونه‌ها آلوده به باسیلوس سرئوس انتروتوکسینیک بودند و در این مطالعه هیدرولیز نشاسته توسط تمام جدایه‌های حاوی ژن *hblA* مشاهده شد. (Das et al. 2009) رابطه بین تولید انتروتوکسین اسهالی و حضور ژن‌های بیماری‌زای متفاوت در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از غذاهای دریابی را بررسی کردند. همه جدایه‌های تولیدکننده انتروتوکسین اسهالی حضور ژن‌های انتروتوکسین را نشان دادند در حالی که جدایه‌های غیر انتروتوکسیک فاقد این ژن بودند.



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR از باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از نمونه‌های ماهی شیزوتوکسین زارودنی با استفاده از آغازگرهای ژن *hblA* (۱۰۰ bp DNA ladder (M) منفی؛ ۲-۹) ایزوله‌های باسیلوس سرئوس که با آزمایش RPLA انتروتوکسینیک بودن آنها نشان داده شد و با آغازگر *hblA* نیز باند ۳۷۲ جفت بازی را نشان دادند.

برای استخراج DNA از باکتری، باکتری‌های رشد کرده در محیط (Brain Heart Infusion) BHI broth با g ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده، باکتری‌های رسوب یافته یکبار در نرمال سالین شسته شد و در ۱۵۰ میکرولیتر آب مفتر اتوکلاو شده، ورتكس شد. سوسپانسیون باکتریایی در حمام آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس بلافالصله در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. بعد رفع انجماد کرده و در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا اضافات تنهشین شود. مایع رویی حاوی DNA است که ۵ میکرولیتر از آن به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (Banerjee et al. 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction (PCR) BL ژن *hblA* زیر واحد B (Chain Reaction) را کد می‌کند یک انتروتوکسین در باسیلوس سرئوس است. توالی ژن *hblA* در باکتری باسیلوس سرئوس 14579 ATCC را از GenBank بدست آورده و سپس یک قطعه آغازگر برای این ژن *hblA* طراحی شد. این آغازگرهای یک قطعه ۳۷۲ جفت بازی از ژن *hblA* را تکثیر می‌کنند (جدول ۱). برای انجام واکنش PCR، مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۱۰ میلیمول Tris، ۵۰ میلیمول KCL، ۰/۲ میکرومول از هر آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن ۵ Cat. No. ۳۱۶۲۰۴۱۸)، ۱/۵ میلیمول MgCl₂، الگو ۵ میکرولیتر و سپس با آب مقطر استریل حجم نهایی را به ۳۰ میکرولیتر رساندیم (Gitahi et al. 2009). برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشت‌سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (Annealing) (اتصال آغازگر به رشته‌های الگو) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر (Extention) توسط DNA پلیمراز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه که ۳ مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار شد و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واکنش‌ها اتمام یافت (Das et al. 2009). محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد تهیه شده در بافر TAE حاوی اتیدیوم برومايد مورد بررسی قرار گرفتند و به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه الکتروفورز

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

تعداد جفت بازها (bp)	توالی اولیگونوکلئوتیدی (۳' → ۵')	ژن <i>hblA</i> در باسیلوس سرئوس
۲۶	GCTAAATGTTAGTTCACCTGTAGCAAC	آغازگر Forward
۲۶	AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA	آغازگر Reverse

جدول ۲- نحوه اجرای واکنش PCR

ردیف	مرحله	درجه حرارت (ساندی گراد)	زمان	تعداد چرخه ها
۱	دنا توره کردن اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
	دنا توره کردن	۹۴	۳۰ ثانیه	
۲	اتصال	۵۸	۴۵ ثانیه	۳۰
	تکثیر	۷۲	۱ دقیقه	
۳	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول ۳- تعداد و درصد نمونه ها

نمونه	تعداد نمونه ها	تعداد نمونه های باسیلوس سرئوس	تعداد نمونه های باسیلوس سرئوس مثبت (%)	انتروتوکسینیک مثبت (%)	تعداد ۹ (۲۵/۸ درصد)
ماهی	۳۵	۱۳ (۳۷/۲ درصد)	۲۵/۸	۹	

نمونه (۲۲/۲ درصد) از پنیر و ۳۱ نمونه (۶۰/۷ درصد) از برنج بودند. روش سریع برای تشخیص حضور باسیلوس سرئوس انتروتوكسینیک در غذا از اهمیت زیادی برخوردار است تا از سلامتی غذای مصرفی اطمینان حاصل شود. روش مرسوم در تفکیک سویه های باسیلوس سرئوس انتروتوكسینیک و RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) است که استفاده از آن از لحاظ زمانی طولانی است، اما استفاده از PCR بر اساس ژن *hblA* سریع تر و ارزان تر برای تشخیص انتروتوكسین باسیلوس سرئوس نتیجه می دهد.

منابع

- Agarwal RK, Kapoor KN, Bachhil VN, Singh BR, Kumar A, Bhilegaonkar KN (1997) Studies on toxicogenicity of *Bacillus cereus* strains isolated from food. Indian Journal Comparative Microbiology Immunology Infectious Disease 18: 162-165.
 Banerjee M, Nair G, Ramamurthy T (2011) Phenotypic and genetic characterization of *Bacillus cereus* isolated from the acute diarrheal patients. Indian Journal of Medical Research 133: 88-95.

Ngamwongsatit et al. (2008) در تایلند با روش PCR وسعت گستردگی پنج ژن انتروتوكسین *nhe ABC cyt K ent FM* را در *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus cereus* بررسی کردند و نتیجه گرفتند پراکندگی این ژن ها در هر دو گروه باسیلوس های یکسان است. Agarwal et al. (1997) وجود ارتباط بین هیدرولیز نشاسته و تولید انتروتوكسین در باسیلوس سرئوس های جدا شده از گوشت و ماهی و شیر و برنج پخته را گزارش کردند. همچنین Gitahi et al. (2009) در کنیا حضور کمپلکس NHE را در تولیدات شیر و پنیر و برنج پخته مطالعه کردند و از ۵۱ نمونه باسیلوس سرئوس جدا شده ۱۲ نمونه (۳۳/۳ درصد) از شیر و ۸

- Beecher DJ, MacMillan J (1990) A novel biocomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. Infection and Immunity 58: 2220-2227.
 Das S, Surendran PK, Thampuran NK (2009) PCR based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Indian Journal Medical Research 129: 316-20.
 Gitahi NJ, Ombui JN, Nduati DW, Gicheru MM (2009) Genetis characterisation of food borne *Bacillus cereus*

strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. International Journal of Integrative Biology 5: 82-86.

Heinrichs JH, Beecher DJ, Macmillan JM, Zilinskas BA (1993) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology 175: 6760-6766.

Lindblad T, Fagerlund A, Rodland MS, Granum PE (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* NHE enterotoxin. Microbiology 150: 3959-3967.

Lund T, Debuyser ML, Granum PE (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology 38: 254-261.

Lund T, Granum PE (1997) Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from different strains of *Bacillus cereus*. Microbiology 143: 3329-3336.

Lund T, Granum PE (1996) Characterization of a non-hemolytic complex from *Bacillus cereus* isolation after a foodborne outbreak. Federation of European Microbiological Societies 141: 151-156.

Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W (2008) Broad

distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, and *entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. International Journal of Food Microbiology 121: 352-6.

Phelps RJ, McKillip JL (2002) Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. Applied Environment Microbiology 68: 3147-3151.

Ryan PA, Macmillan JM, Zilinskas BA (1997) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology 179: 2551-2556.

Tallent S, Kotewicz K, Bennett R (2012) Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, Journal of the Association of Official Analytical Chemists 95: 446-451.

Valero M, Hernández-Herrero LA, Giner MJ (2007) Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. Food Microbiology 24: 671-7.