Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۸۴- ۱۷۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۰۴ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

بررسی سویه‌های *اشرشیا کلی (E.coli)* به‌دست آمده از بستنی سنتی بر اساس پروفایل پروتئینی در شهر اصفهان

مریم رنجبر: کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، maryamranjbar84@yahoo.com
رضا ندائی نیا *: دکترا تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، nedaeinr901@mums.ac.ir
محمد گلی: استادیار علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران، mgolifood@yahoo.com
مصطفی مانیان: کارشناس ارشد ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mostafamanian@gmail.com
محمد رضا مراثی: دانشیار آمار زیستی و اپیدمیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، mrmaracy@yahoo.co.uk
منصور فیضی: کارشناس ارشد سم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، manfeizi@yahoo.com
نفیسه کارگران: کارشناس علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران، nkargaran1347@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌هایی که در مواد غذایی حضور دارند، تحت تأثیر فرآیندهای مختلف دمایی نظیر سرما و گرما قرار می‌گیرند. این موارد باعث ایجاد شوک در باکتری‌ها شده و آن‌ها را وادار به تولید پروتئین‌ها و بعضاً تغییراتی در تولید آنزیم‌ها کرده که این امر می‌تواند ویژگی خاصی به آن‌ها داده که اطلاع از این ویژگی در تشخیص به موقع و دقیق‌تر کمک کننده است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر، بیش از ۱۰۰ نمونه به شکل تصادفی از نقاط مختلف شهر اصفهان جمع‌آوری و تعداد ۴۸ جدایه اندول مثبت از آن‌ها جداسازی شد. این جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های فنوتیپی و الکتروفورز پروتئین ارزیابی شدند.

نتایج: بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، با بهره‌مندی از تحلیل‌های عددی و دندروگرام ترسیم شده بر مبنی روش jacard، جدایه‌ها در ۸ گروه قرار گرفتند. این گروه‌ها نتیجه تفاوت فنوتیپی بین استرین‌ها و اختلاف آن‌ها در استفاده از منابع کربنی مختلف بود. بنابراین، جدایه‌های گروه یک و دو به سویه *اشرشیا کلی* (معادل ۷۹ درصد) تعلق داشتند. جدایه‌های به‌دست آمده از بستنی در الگوی الکتروفورزی دارای دو باند پروتئینی در ناحیه ۲۳/۵۹ و ۲۰/۷۹ کیلو دالتون بودند، که از این لحاظ با جدایه استاندارد تفاوت داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: به علت وجود تفاوت‌های بیوشیمیایی و مولکولی، به ویژه در دو باند پروتئینی یاد شده در جدایه‌های به‌دست آمده، در مقایسه با جدایه استاندارد، می‌توان نتیجه گرفت جدایه‌های باکتریایی موجود در بستنی به علت آنکه تحت تاثیر فرآیندهای مختلف دمایی قرار می‌گیرند، تحریک به تولید پروتئین‌ها و بعضاً تغییراتی در تولید آنزیم‌ها شده، که می‌تواند ویژگی خاصی به این جدایه‌ها داده، و در نهایت، باعث ابهام در تشخیص شود. بنابراین بررسی‌های مولکولی بیشتری در این زمینه نیاز است انجام شود.

واژه‌های کلیدی: *اشرشیا کلی*، بستنی، الگوی پروتئینی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

وجود مواد مغذی با ارزش شرایط را برای رشد و فعالیت بسیاری از میکروارگانیسم‌ها فراهم می‌کند. مواد غذایی یکی از منابع مهم ایجاد آلودگی توسط عوامل شیمیایی و زیستی محسوب می‌شود. به طوری‌که تخمین زده می‌شود ۷۰ درصد بیماری‌های عفونی از طریق مواد غذایی ناسالم به انسان سرایت می‌کنند (۱). برخی از سویه‌های تولید کننده توکسین نظیر *E. coli* O26 پس از *E. coli* O157:H7 مسئول ایجاد اسهال و ادرار خونی در انسان است. گاو به عنوان یک مخزن مهم سویه O26 شناخته شده است. با توجه به بالا بودن *اشرشیا کلی* تیپیک نسبت به این سویه‌ها که به تعداد کم بیماری‌زا هستند و آزمون‌های مثبت کاذب کمتری نسبت به سویه‌های تولید کننده توکسین دارند. بنابراین، تشخیص زود هنگام آن مهم جلوه می‌کند. سویه‌های به‌دست آمده از گاو و انسان از لحاظ الگوی پلیمورفیسم و ژن‌های بیماری‌زا یکسان هستند بنابراین، انتقال بین دو گونه ممکن است رخ دهد. شیوع با جدایه های تولید کننده توکسین متاسفانه با وجود ارتقای سطح بهداشتی هنوز در تمامی کشورها گزارش می‌شوند. چند صد شیوع از سویه های Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157 و سویه های non-O157 تاکنون گزارش شده است. اهمیت موضوع در این موارد به اندازه‌ایی است که در موارد شیوع پایین بررسی‌های گسترده برای پی بردن به منشاء آلودگی انجام می‌شود و گاهی یک چالش بهداشتی محسوب شده تا آنجا که در بسیاری موارد روش‌های تشخیصی جدیدتر جایگزین روش های معمول می‌شود و سیستم سلامت محور تنها به درمان فرد بسنده نکرده بلکه ریشه‌کنی منشاء آلودگی را در دستور کار قرار می‌دهد. بنابراین، برای پی بردن به سلامت میکروبی مواد غذایی شاخص میکروبی تعریف می‌شود (۲). شاخص‌های میکروبی بیشتر به منظور ارزیابی ایمنی و بهداشت مواد غذایی به کار می‌روند (۳). نخستین شاخص آلودگی مدفوعی *اشرشیا کلی* است (۴). به منظور از بین بردن میکروارگانیسم‌های موجود در مواد غذایی، معمولاً مخلوط حاصل را در دمای مناسب پاستوریزه می‌کنند (۵). بنابراین، رعایت نکردن موارد بهداشتی در تهیه، نگهداری و عرضه می‌تواند سلامت مصرف کننده را به خطر بیندازد. *اشرشیا کلی* از مهم‌ترین آلوده کننده‌های مواد غذایی محسوب می‌شود (۶). جایگاه اصلی این باکتری کلون انسان و حیوانات خون‌گرم است و در صورتی‌که از طریق مدفوعی- دهانی منتقل شود، اسهال ایجاد می‌کند (۷). با توجه به اینکه *اشرشیاکلی* باکتری مقاومی است که می‌تواند هفته‌ها و ماه‌ها در آب و مواد غذایی به‌ویژه در حرارت صفر درجه زنده بماند و از آنجا که بستنی به عنوان یک ماده غذایی توسط سنین مختلف استفاده می‌شود. از نظر منبع تهیه و شرایط بافری و دمایی بسیار مستعد برای آلودگی با این باکتری‌هاست (۸). اگر چه تعداد این باکتری تحت تاثیر سایر فلور طبیعی روده نظیر باکتروئیدز قرار دارد ولی با این وجود میزان آن همواره در روده غالب است (۹).

این باکتری از عوامل اصلی ایجاد کننده اسهال در کشورهای توسعه نیافته است. انتقال بیماری از طریق انسان ـ موادغذایی ـ حیوان است. حداقل در بیماری‌زایی 10^3 در هر گرم ماده غذایی است. میزان مرگ و میر ناشی از این باکتری در نوزادان بسیار بالاست. در ضمن، عامل اصلی بیماری اسهال مسافران بوده و این بیماری در نقاطی که بهداشت فردی رعایت نمی‌شود شایع است. معمولا اسهال مسافران به سرعت ایجاد نمی‌شود و ممکن است ۲ تا ۳ روز بعد از خوردن یا هنگام بازگشت به منزل ایجاد شود. برخی مواد غذایی در معرض خطر عبارتند از، گوشت، فراورده های لبنی، شیر، آب آلوده که مهم‌ترین منبع آلودگی، سبزی های خام و سالاد

www.SID.ir

Archive of SID

است. پیشگیری از آن شامل، کنترل بهداشت دست اندرکاران تولید و تهیه مواد غذایی، کنترل آب مصرفی و شستن دست ها از عوامل عمده پیشگیری از انتقال بیماری می باشد (۱۰). *اشرشیاکلی*، پاتوژن فرصت طلبی است که در روده بزرگ انسان و سایر حیوانات وجود دارد. وجود این باکتری در آب و مواد غذایی دلیل بر آلودگی آن‌ها از طریق منابع مدفوعی است. عفونت ادراری، سپتی سمی، منتژیت نوزادی و اسهال مسافران، شایع‌ترین عوارض بیماری هستند (۱۱). طبق تخمین سازمان جهانی بهداشت موارد واقعی بیماری‌های ناشی از آلودگی غذایی بیش از ۳۰ تا ۳۵ برابر موارد دیگر ثبت شده است (۱۰).

جدایه‌های باکتریایی که در مواد غذایی حضور دارند، تحت تاثیر فرآیندهای مختلف دمایی نظیر سرما و گرما قرار می‌گیرند. این فرآیندها باعث ایجاد شوک در باکتری‌ها شده و باکتری‌ها را وادار به تولید پروتئین‌ها و در برخی موارد تغییراتی در تولید آنزیم‌ها ایجاد می‌کند. تغییر در بیان پروتئین‌ها و آنزیم‌ها باعث شده ویژگی‌های بیوشیمیایی و احتیاجات تغذیه‌ای این باکتری‌ها نسبت به جدایه‌هایی که در این شرایط قرار نگرفته‌اند تغییر کند و این تغییر در ویژگی‌ها می‌تواند باعث خطا در تشخیص شود. این امر باعث شده اطلاع از الگوی پروتئینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد و نشان دهد جدایه‌های حاصل دچار تغییراتی به علت شوک دمایی شده‌اند یا خیر. به نظر می‌رسد این تغییرات ویژگی خاصی به جدایه‌ها داده و اطلاع از این ویژگی‌ها می‌تواند در تشخیص به موقع و دقیق‌تر کمک کننده باشد. هدف از پژوهش حاضر مقایسه نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و الگوی الکتروفورزی پروتئین بین سویه‌های *E.coli* به‌دست آمده از بستنی و سویه استاندارد برای پی بردن به وجود تنوع در سویه‌های *اشرشیا کلی* به‌دست آمده از بستنی در شهر اصفهان است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: برای تعیین آلودگی بستنی‌های سنتی به شکل تصادفی از نقاط مختلف شهر اصفهان در یک طرح کاملاً تصادفی نمونه‌گیری انجام شد تا تمام نمونه‌ها دارای شانس مساوی باشند. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در فریزر منفی ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲تا ۴ ساعت نگهداری شدند.

جداسازی: با استفاده از پیپت سترون مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از آزمونه با رقت ۰/۱ را به ۱۰ میلی‌لیتر لوله حاوی محیط کشت LMX[1] با غلظت مضاعف (۶۸ گرم در لیتر) محتوی لوله درهم اضافه شد و به مدت۷ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. تغییر رنگ محیط مایع به سبز مایل به آبی و ایجاد گاز به عنوان شاخص حضور *اشرشیاکلی* در محیط کشت است. سپس، به هر یک از لوله‌ها مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید یک مولار اضافه شد در صورت ایجاد نور فلورسانس در طول موج ۳۶۶ نانومتر و ایجاد حلقه قرمز با افزودن معرف کواکس[2] حضور *اشرشیاکلی* تایید شد. در صورت عدم تغییر رنگ و ایجاد گاز، گرمخانه‌گذاری تا ۲۴ ساعت دیگر افزایش یافت. قبل از اضافه کردن معرف اندول، برای جداسازی جدایه‌ها با استفاده از یک لوپ سترون روی محیط کروموکالت آگار کشت خطی داده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. *اشرشیاکلی* به شکل کلونی‌های آبی تیره و بنفش، سایر گروهای *کلی فرم* به شکل کلونی‌های قرمز رنگ و میکرو فلورها به شکل بی‌رنگ مشاهده شد. کلونی‌های بنفش و آبی انتخاب و روی محیط آگار مغذی[3] کشت، به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شد. در این روش پس از تهیه رقت‌های ۰/۱، آزمون‌های میکروبی با توجه به روش‌های استاندارد انجام شد (۱۲). تعداد ۴۸ جدایه اندول مثبت، بررسی شدند. جدایه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

خالص به آگار مغذی درون لوله منتقل و برای آزمون تکمیلی در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین، برای نگهداری تمام جدایه‌ها در سرم فیزیولوژی، تعدادی کلونی از کشت تازه هر جدایه به اپندورف‌های حاوی سرم فیزیولوژی سترون منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای نگهداری دراز مدت، جدایه‌های خالص به لوله‌های حاوی محیط آگار مغذی منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. سپس، پارافین مایع سترون به لوله‌های کشت اضافه و در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ویژگی‌های کشت و واکنش‌های بیو شیمیایی: تمامی جدایه‌ها با جدایه استاندارد *اشرشیا کلی* کد ۱۳۹۹ [۴] تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران در آزمون‌های بیوشیمیایی مقایسه شدند. واکنش گرم باکتری‌ها به دو روش رنگ‌آمیزی بر اساس روش اصلاح شده هوکر [۵] و حلالیت در هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد انجام شد (۱۳-۱۵). برای بررسی ریخت‌شناختی میکروارگانیسم از رنگ‌آمیزی ساده استفاده شد (۱۵). آزمون‌های کاتالاز [۶]، اکسیداز [۷]، ذوب ژلاتین، تولید گاز از گلوکز به روش شاد [۸] انجام شد (۱۶). برای تمایز بین متابولیسم تخمیری از اکسیدی از محیط O/F ساخت شرکت مرک آلمان استفاده شد. تولید متیل رد و استوئین [۹] در محیط آماده MR/VP، احیای نیترات در محیط آماده نیترات برات ساخت شرکت مرک آلمان [۱۰] انجام شد. برای انجام آزمون تولید اوره آز از محیط پایه اوره آگار [۱۱] حاوی ۴۰ درصد اوره فیلترشده (۰/۲۲ میکرون) استفاده شد. بقیه آزمون‌ها از جمله تولید سولفور، اندول، حرکت، مصرف سیترات، مصرف گلوکز، لاکتوز و سوکروز [۱۲] روی محیط آماده ساخت شرکت مرک کشور آلمان انجام شد. برای بررسی پروفایل پروتئین‌ها از کیت شرکت سیتومتین ژن [۱۳] ساخت ایران مطابق دستور سازنده استفاده شد.

تحلیل عددی [۱۴]: برای دسته‌بندی جدایه‌ها بر اساس متغیرهای بیوشیمیایی مهم و ترسیم دندروگرام از روش تحلیل عددی استفاده شد. برای گروه‌بندی جدایه‌ها از تجزیه خوشه ای [۱۵] و برنامه [۱۶] ترسیم نمودار استفاده شد (۱۷).

روش انجام الکتروفورز پروتئین: الکتروفورز در قالب دو ژل دارای یک بخش متراکم کننده [۱۷] در بالا و یک بخش جدا کننده [۱۸] در پایین انجام شد. ژل جداکننده با غلظت ۱۲ درصد و ژل متراکم کننده با غلظت ۶ درصد به روش اصلاح شده لاملی [۱۹] به شکل عمودی [۲۰] انجام شد (۱۸). قبل از قرار دادن نمونه‌ها در حفره‌های ژل، از محلول ۰/۰۰۲ درصد برم فنل بلو حاوی ۱۵ درصد گلیسرول به‌عنوان نشانگر استفاده شد. سپس، ۳۰ میکرولیتر از نمونه‌ها در حفره‌های ژل قرار داده شدند. پس از قرار گرفتن نمونه‌ها در چاهک‌های ژل، الکتروفورز به مدت ۴ ساعت در ۱۰۰ ولت با شدت جریان ۲۰ میلی‌آمپر و دمای ثابت ۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از رسیدن نشان گر به انتهای ژل صفحات شیشه‌ای از دستگاه خارج و ژل از بین آن بیرون آورده شد. رنگ‌آمیزی با محلول ۰/۱ درصد کوماسی بلو در محلول آب، متانول، اسید استیک به نسبت ۱:۵:۵ به مدت یک شبانه روز روی شیکر با سرعت ۵۹ R_{pm} انجام شد. سپس، رنگ بری با متانل، آب، اسید استیک به نسبت ۱:۵:۵ به مدت ۳ ساعت انجام شد و ژل در محلول ۷ درصد اسید استیک نگهداری شد. برای ترسیم رگرسیون از مارکر مولکولی LMW-SDS Marker Kit [۲۱] استفاده شد. لگاریتم وزن مولکولی مارکر و فاصله طی شده از سطح ژل برای هر باند مارکر محاسبه تا معادله رگرسیون برای نشان دادن وزن مولکولی باندهای مجهول ترسیم شود.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

ویژگی‌های بیوشیمیایی کلی فرم‌های جدا شده: از نمونه‌های مختلف بستنی سنتی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف شهر اصفهان باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای شکل با طول ۲ تا ۶ میکرون و عرض ۱ تا ۱/۵ میکرون، متحرک، واجد تاژک محیطی، فاقد اسپور، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی، قادر به احیای نیترات، تخمیری، از نظر کپسول بعضی کلونی‌های موکوئیدی و واجد کپسول ولی بیشتر آن‌ها فاقد کپسول قادر به تولید اندول که به طور قابل توجهی به سویه *اشرشیا کلی* شباهت داشتند، جداسازی شد. پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، سایر آزمون‌های بیوشیمیایی برای تشخیص قطعی تر انجام شد. تمامی جدایه‌های به‌دست آمده از بستنی‌ها روی محیط آگار مغذی در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. ایجاد کلونی‌های صاف، مدور، خاکستری با سطح براق و لبه‌های گرد به اندازه ۱ تا ۳ میلی‌متر دارای قوام کره‌ای و روی محیط‌های کشت ائورین متیلن بلو و کرومو کالت آگار قادر به رشد بودند، محیط آبگوشت مغذی را به طور یکنواخت کدر می‌کنند و رسوبی در ته لوله بوجود می‌آورند که با تکان دادن حل می‌شود قادر به تولید گاز از لاکتوز در محیط LMX بودند(شکل ۱). از میان ۴۸ جدایه اندول مثبت به‌دست آمده (شکل۲)، ۷۱ درصد قادر به ایجاد رنگ سبزمتالیک در محیط ائوزین متیلن بلو، ۸۳ درصد قادر به ایجاد کلونی آبی بنفش روی محیط کروموکالت آگار، واکنش متیل رد و تولید استوئین به ترتیب ۹۶ و ۲ درصد مثبت، ۸ درصد قادر به هیدرولیز ژلاتین، ۷۱ درصد قادر به ایجاد رنگ فلورسانت در محیط LMX در مقابل نور فرابنفش با طول موج ۳۶۶ نانومتر، ۸۴ درصد جدایه‌ها قادر به ایجاد رنگ آبی در محیط LMX، ۱۳ درصد قادر به تولید اوره آز و ۸۸ درصد قادر به حرکت بودند. ۸۵ درصد جدایه‌ها روی محیط مک کانکی به علت تخمیر لاکتوز کلونی‌های قرمز رنگ بوجود آوردند. نتایج ویژگی‌های بیوشیمیایی در جدول ۱ مشخص شده است.

تحلیل عددی: به علت وجود تنوع بیوشیمیایی میان جدایه‌ها و عدم تشخیص قطعی از دسته‌بندی جدایه‌ها استفاده شد. خوشه‌ها بر حسب متغیرهای مهم دسته‌بندی شد. تحلیل عددی بیان گر قرار گرفتن جدایه‌ها در ۸ گروه بر اساس اختلاف در آزمون‌های بیوشیمیایی بودند (شکل ۳).

شکل ۱- رنگ آبی مایل به سبز در لوله سمت چپ و تولید اندول در لوله وسط در مقایسه با لوله شاهد سمت راست

شکل ۲- واکنش *اشرشیا کلی*، تولید گاز در محیط Triple sugar iron agar عدم مصرف سیترات در محیط سیمون سیترات و تولید اندول در محیط تریپتون واتر برات

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- ویژگی‌های گروه‌های انتروباکتریاسه جداشده از بستنی

شماره گروه / آزمون	درصد استرین‌های مثبت هر گروه								*E.coli* ATCC1399
	۱ (۳۴)	۲ (۴)	۳ (۲)	۴ (۱)	۵ (۱)	۶ (۱)	۷ (۴)	۸ (۱)	
گرم	–	–	–	–	–	–	–	–	–
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
احیای نیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+
متابولیسم تخمیری	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ایجاد رنگ فلورسانت روی LMX	+	–	–	–	–	–	–	–	+
ایجاد رنگ سبز متالیک روی EMB	+	–	–	–	–	–	–	–	+
ایجاد رنگ سبز آبی روی LMX	+	+	+	+	–	–	–	–	+
ایجاد کلونی قرمز روی مک کانکی آگار	+	+	+	–	–	+	–	–	+
ایجاد کلونی بنفش روی کروموکالت آگار	+	+	۵۰	+	–	–	–	–	+
تولید پیگمان	–	–	+	–	–	–	–	–	–
هیدرولیز اوره	–	–	–	–	+	+	+	–	–
مصرف سیترات	–	–	–	–	+	+	–	–	–
متیل رد (MR)	+	+	+	–	+	–	+	+	+
تولید استوئین (VP)	–	–	–	–	–	+	–	–	–
هیدرولیز ژلاتین	۹	۱۱	–	–	–	–	۲۵	–	–
هیدرولیز لیزین	۶۰	۵۰	–	+	–	+	۵۰	–	+
تولید اندول	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+
حرکت	+	+	+	–	+	–	–	+	+
تولید گاز از گلوکز	+	+	+	–	–	+	–	–	+
تولید H_2S از سیستئن	–	–	–	–	–	–	–	–	–
واکنش اسیدی (ACID /acid +G)	+	+	+	–	–	+	–	–	+
تولید قلیا (ALK/acid)	–	–	–	+	+	–	–	+	–
سیترات	–	–	–	–	+	+	–	–	–
سوکروز	(+)	(+)	ND	–	–	+	–	ND	+
مالتوز	(+)	(+)	ND	(+)	–	+	–	ND	(+)
ملیبیوز	(+)	(+)	ND	(+)	–	+	–	ND	(+)
سلوبیوز	–	–	ND	–	–	+	–	ND	–
ترهالوز	+	+	ND	+	–	+	–	ND	+
سوربیتول	(+)	(+)	ND	(+)	–	+	–	ND	(+)
ملونات	–	–	ND	–	–	+	–	ND	–

+: بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها در مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت مثبت بودند.

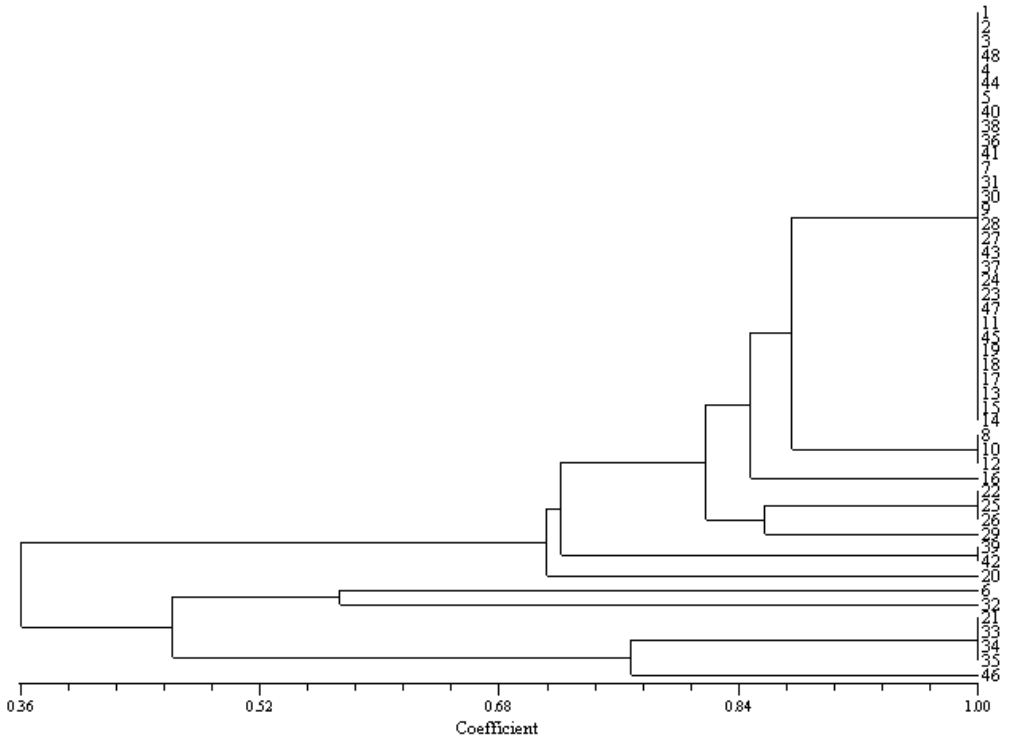
-: بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها در مدت ۵ روز منفی بودند.

(+): بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها پس از ۷۲ ساعت مثبت تاخیری بودند.

ND: Not Determine

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳ - گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس شباهت در آزمون‌های بیوشیمیایی شامل گروه اول (از جدایه ۱تا جدایه ۱۶)، گروه دوم (از جدایه ۲۲ تا جدایه ۲۹)، گروه سوم (از جدایه ۳۹ تا جدایه ۴۲)، گروه چهارم (جدایه ۲)، گروه پنجم (جدایه ۶)، گروه ششم (جدایه ۳۲)، گروه هفتم (از جدایه ۲۱تا جدایه ۳۵) و گروه هشتم (جدایه ۴۶)

در نتایج ۳۱ آزمون فنوتیپی تنوع ما بین زیر گونه استاندارد و جدایه‌های به‌دست آمده مشاهده شد. با استفاده از تحلیل عددی و ترسیم دندروگرام جدایه‌ها در ۸ گروه قرار گرفتند. این گروه‌ها نتیجه تفاوت فنوتیپی بین استرین‌ها و اختلاف آن‌ها در تولید اسید با استفاده از منابع کربنی مختلف بود.

جدایه‌های گروه اول قادر به ایجادکلونی‌هایی با رنگ سبز متالیک روی محیط ائوزین متیلن بلو، کلونی‌هایی با رنگ بنفش روی کروموکالت آگار و رنگ فلورسانت در مقابل لامپ ماوراء بنفش با طول موج ۳۶۶ نانومتر، متیل رد مثبت، تولید استوئین منفی، متحرک، فاقد توانایی هیدرولیز اوره و فاقد توانایی مصرف سیترات بودند، همچنین، قادر به هیدرولیز لیزین و قادر به تخمیر گلوکز در شرایط بی‌هوازی بوده که از این جهات کاملاً شبیه جدایه‌های استاندارد بودند. ولی تنها ۹ درصد جدایه‌های گروه یک قادر به هیدرولیز ژلاتین بودند که از این لحاظ با جدایه استاندارد اختلاف داشتند.

استرین گروه دوم قادر به ایجاد رنگ سبز متالیک روی محیط ائوزین متیلن بلو نبودند که از این لحاظ با جدایه استاندارد اختلاف داشتند. ولی همگی توانایی تولید کلونی قرمز رنگ روی محیط مک کانگی آگار را داشتند. تمامی جدایه‌ها قادربه ایجاد رنگ آبی در محیط LMX بوده ولی هیچکدام قادر به ایجاد رنگ

www.SID.ir

Archive of SID

فلورسانت در مقابل نور فرابنفش با طول موج ۳۶۶ نانومتر نبودند که از این لحاظ با جدایه‌های استاندارد اختلاف داشتند. تمامی جدایه‌ها متحرک، فاقد توانایی هیدرولیز اوره و فاقد توانایی مصرف سیترات بودند. متیل رد مثبت و تولید استوئین منفی، فاقد توانایی هیدرولیز ژلاتین، متحرک، قادر به ایجاد واکنش Acid /Acid+G و تنها ۵۰ درصد جدایه‌ها قادر به هیدرولیز لیزین بودند، که از این لحاظ بسیار شبیه به جدایه استاندارد بودند. همچنین، نقوش الکتروفورزی جدایه‌های فوق شباهت بسیار زیادی به جدایه استاندارد داشتند. اما جدایه‌های این گروه مانند جدایه‌های گروه ۲ شدیداً تخمیری نبودند.

جدایه‌های گروه سوم عدم توانایی تولید رنگ سبز متالیک روی محیط ائوزین متیلن بلو و کلونی‌های قرمز رنگ روی محیط مک کانگی آگار را داشته، ۵۰ درصد جدایه‌ها قادر به ایجاد کلونی‌های آبی بنفش روی محیط کروموکالت آگار بودند. همگی قادر به ایجاد رنگ آبی در محیط LMX broth بودند، ولی فاقد توانایی ایجاد فلورسانت در مقابل نور فرابنفش با طول موج ۳۶۶ نانومتر بودند. تمامی جدایه‌ها قادر به تولید پیگمان زرد روی محیط آگار مغذی، فاقد توانایی هیدرولیز اوره، فاقد توانایی مصرف سیترات، قادر به تولید متیل رد، فاقد توانایی تولید استوئین، فاقد توانایی هیدرولیز ژلاتین، متحرک، قادر به تولید واکنش Acid /Acid+G در محیط TSI و فاقد توانایی هیدرولیز لیزین بودند که از این لحاظ به *Escherichia hermani* شباهت داشتند.

جدایه‌های گروه چهارم فاقد توانایی تولید رنگ سبز متالیک روی محیط ائوزین متیلن بلو و فاقد توانایی ایجاد کلونی‌ها به رنگ قرمز در محیط مک کانگی آگار بوده، ولی قادر به ایجاد کلونی‌هایی به رنگ آبی بنفش در محیط کروموکالت آگار و ایجاد رنگ آبی فاقد فلورسانت در محیط LMX broth بودند. آن‌ها فاقد پیگمان، فاقد هیدرولیز اوره، فاقد توانایی مصرف سیترات، متیل رد منفی و فاقد توانایی تولید استوئین، غیر متحرک ولی قادر به هیدرولیز لیزین بوده که بر اساس آزمون‌های بیو شیمیایی به *E.coli* (Metabolically Inactive Strains) شباهت داشتند، ولی با *شرشیاکلی* تیپیک کاملاً متفاوت بودند.

جدایه‌های گروه پنجم فاقد توانایی تولید رنگ سبز متالیک در محیط ائوزین متیلن بلو و فقدان تولید کلونی‌های قرمز رنگ در محیط مک کانگی آگار، فقدان تولید کلونی‌های آبی بنفش در محیط کروموکالت آگار، فقدان تولید رنگ آبی و فلورسانت در محیط LMX broth قادر به هیدرولیز اوره، قادر به مصرف سیترات، متیل رد مثبت، متحرک و ایجاد واکنش ALK/acid در محیط TSI، فاقد توانایی هیدرولیز لیزین بوده و به *Providencia rettgeri* شباهت داشتند.

جدایه‌های گروه ششم به علت هیدرولیزه اوره، مصرف سیترات، ایجاد کلونی‌های قرمز رنگ روی محیط مک کانگی آگار، متیل رد منفی، قادر به تولید استوئین، غیر متحرک، ایجاد واکنش Acid /Acid+G و توانایی هیدرولیز لیزین به *Klebsiella oxytoca* شباهت داشتند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های گروه هفتم به علت هیدرولیز اوره، عدم مصرف سیترات، تولید اسید مخلوط (متیل رد مثبت) فاقد تولید استوئین ایجاد واکنش ALK/acid در محیط TSI، فقدان تولید کلونی‌های قرمز رنگ در محیط مک کانگی آگار، فقدان ایجاد رنگ سبز متالیک در محیط ائوزین متیلن بلو[۲۲]، فقدان ایجاد رنگ آبی همراه با فلورسانت در محیط LMX broth شباهت زیادی به *Morganella morgani* داشتند.

جدایه گروه هشتم نیز به علت تولید اسید مخلوط، متیل رد مثبت، ایجاد واکنش ALK/acid در دندروگرام به جدایه *M.morgani* شباهت داشت ولی به علت عدم توانایی در هیدرولیز اوره و متحرک بودن باآن اختلاف داشت و به علت آنکه از لحاظ سایر ویژگی‌های متابولیکی ضعیف بود و واکنش‌هایی بینابینی با سایر جنس‌های خانواده انتروباکتریاسه نشان می‌داد نظیر شباهت‌هایی که با *E.coli* (Metabolic inactive) داشت در هیچ گروه شناخته شده‌ای طبقه‌بندی نشد.

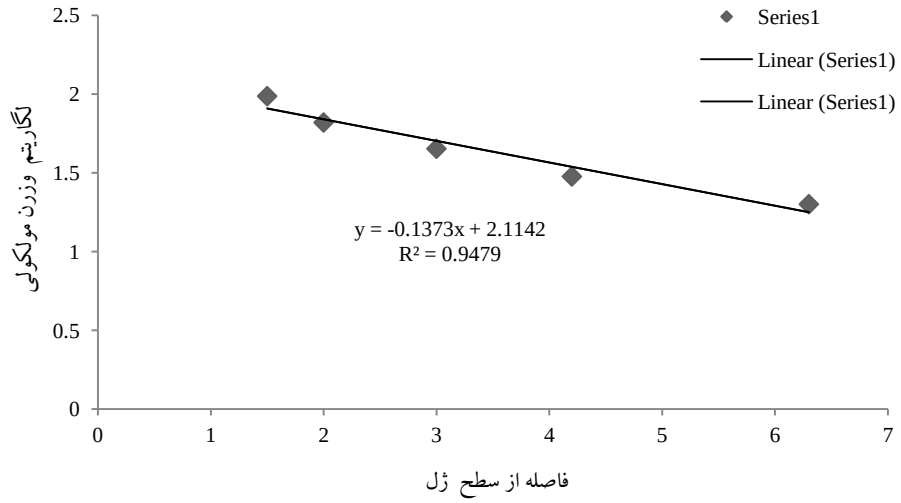
الکتروفورز پروتئین سلولی: باکتری‌ها روی محیط آگار مغذی کشت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس، کلونی‌ها در آب مقطر سترون سوسپانسیون و OD آن‌ها روی ۲/۳ تا ۳ واحد در ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر تنظیم شد. به نمونه‌ها بافر حاوی سدیم دودسیل سولفات، ۲- مرکاپتواتانول[۲۳] اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از لیز شدن و استخراج پروتئین، الکترو فورز در ژل ۱۲درصد پلی‌اکریل آمید درسیستم ناپیوسته مطابق دستورالعمل کیت انجام شد.

نمودار رگرسیون برای نشان دادن وزن مولکولی ترسیم شد، که نشان می‌دهد با هر واحد افزایش فاصله از سطح ژل، در حدود ۰/۱۴ از لگاریتم وزن مولکولی مارکر کاسته خواهد شد و در حالت کلی ۰/۹۵ از تغییرات لگاریتمی وزن مولکولی توسط فاصله طی شده در ژل جدا کننده بر مبنی کیلودالتون قابل پیشگویی است (شکل ۴).

در مقایسه الکتروفورز پروتئین‌های جدایه‌ها با یکدیگر و جدایه استاندارد *اشرشیا کلی* کد ۱۳۹۹، شباهت بسیار زیادی بین جدایه‌های جداسازی شده با یکدیگر و جدایه استاندارد قابل مشاهده بود. ولی اختلافاتی نیز وجود داشت. در جدایه شماره ۳ پنج باند پروتئینی به وزن مولکولی ۸۰/۹۵، ۲۴/۳۵، ۲۲/۱۵، ۱۷/۷۵ و ۱۲/۱۵ کیلو دالتون وجود داشت. که ازاین نظر با جدایه‌های استاندارد اختلاف داشتند. جدایه شماره ۴۲ دارای یک باند به وزن ۲۳/۵۹ کیلو دالتون و باند دیگر به وزن ۲۰/۷۹ کیلو دالتون بود که با جدایه استاندارد اختلاف داشت. جدایه‌های شماره ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۸ و ۱ دارای یک باند پروتئینی به وزن مولکولی ۹/۷۳ کیلودالتون بودند که با جدایه استاندارد اختلاف داشت. همچنین، جدایه‌های شماره ۱۱ و ۱۲ دارای یک باند پروتئینی به وزن مولکولی ۱۶/۶۶ کیلودالتون بودند که از این لحاظ با جدایه استاندارد اختلاف داشتند. نمونه‌گیری مجدد با تعداد بیشتر جدایه‌ها انجام شد تا الگوی دقیق‌تری از پروفایل‌های پروتئینی جدایه‌های *اشرشیاکلی* به‌دست آید. در الگوهای الکتروفورزی سایر سویه‌های به‌دست آمده از بستنی این اختلاف با جدایه استاندارد قابل مشاهده بود (شکل ۵).

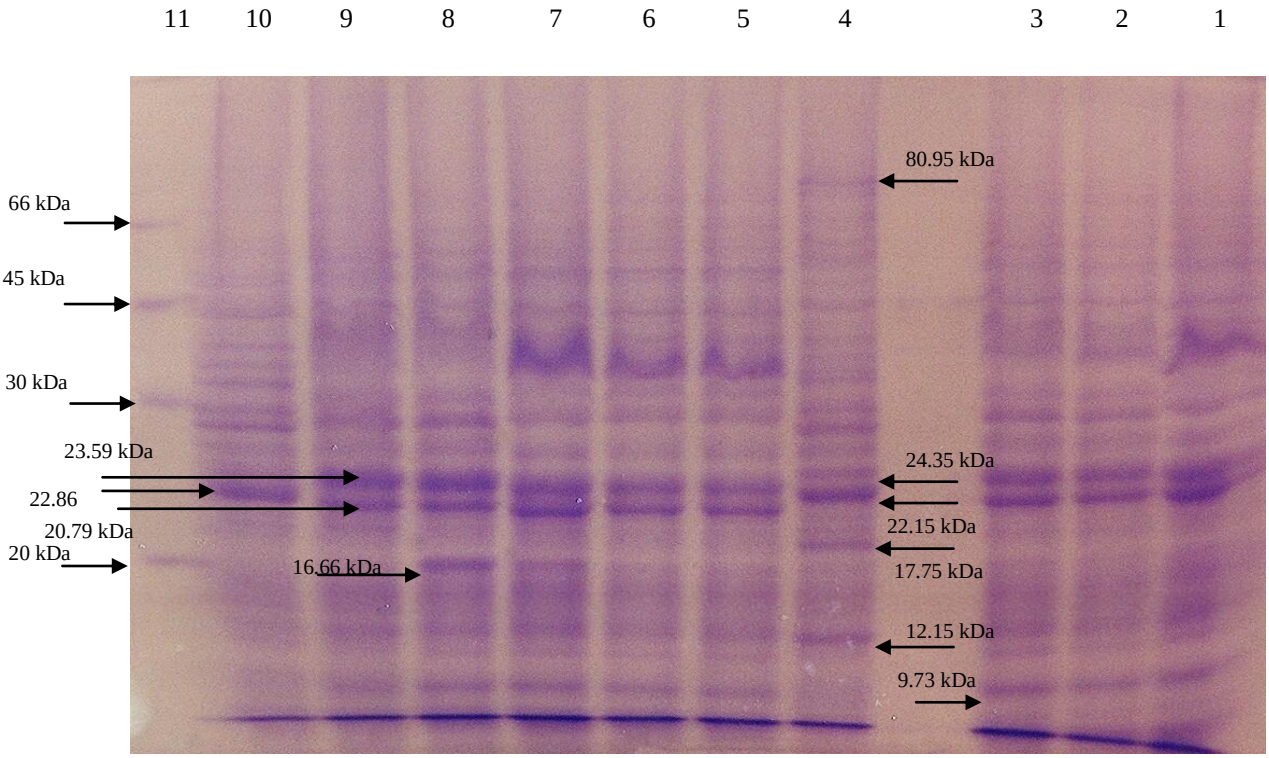
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۴- رگرسیون بین وزن مولکولی مارکر و فاصله طی شده در ژل جدا کننده

Lane 1, 13; Lane 2, 1; Lane 3, 2; Lane 4, 3; Lane 5, 5; Lane 6, 7; Lane 7, 11; Lane 8 ,12 ; Lane 9, 10 and Lane 10, Reference strains *E. coli* ATCC ; Lane 11, Marker



شکل۵- نقوش الکتروفورزی جدایه‌های به‌دست آمده در مقایسه با جدایه استاندارد

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌هایی که در مواد غذایی حضور دارند تحت تاثیر فرآیندهای مختلف دمایی نظیر سرما و گرما قرار می‌گیرند. این موارد باعث ایجاد شوک در باکتری‌ها شده و باکتری را وادار به تولید پروتئین‌ها و در برخی موارد تغییراتی در تولید آنزیم‌ها نموده که این امر می‌تواند ویژگی‌های خاصی به آن‌ها داده که اطلاع از این ویژگی در تشخیص به موقع و دقیق‌تر کمک کننده است. در این بررسی جدایه‌های اندول مثبت نظیر *E.coli (inactive)*، *E.hermani*، *P.rettgeri*، *K.oxytoca*، *M.mogani* می‌توانستند در نتیجه نهایی خطا ایجاد کنند، اما تحلیل‌های انجام شده با استفاده از محیط‌های حاوی مواد کروموژنیک نظیر LMX broth و کرموکالت آگار و و ایجاد فلورسانت در طول موج ۳۶۶ نانومتر نشان داد، که با حداقل خطای احتمالی می‌توان *اشرشیا کلی* را شناسایی کرد. البته باید به این نکته توجه کرد که در این روش بستنی‌های حاوی مواد رنگی نظیر زعفران، کاکائو، توت فرنگی و ... به علت ایجاد تغییر رنگ محیط و اختلال در فلورسانت حاصل می‌تواند باعث ایجاد خطا در نتیجه آزمون شود و از آنجا که رنگ فلورسانت اهمیت زیادی دارد، در این بررسی کوشش شد تا بیشتر از نمونه‌های شیری پاستوریزه استفاده شود، هر چند از نمونه‌های حاوی مواد رنگی نیز استفاده شد، ولی به علت ایجاد رقت بالا برای حل این مشکل، زمان جواب در این روش طولانی‌تر شد. اگر از رقت یک‌دهم استفاده شود بسته به تعداد *اشرشیا کلی* در نمونه، جواب آزمون بین ۷ تا ۲۴ ساعت زمان لازم دارد. در بررسی‌های انجام شده نتایج حاصل از میزان آلودگی به *اشرشیا کلی* با نتایج کریم[۲۴] و همکاران مطابقت داشت. بررسی‌های انجام شده نشان داد جدایه‌های به‌دست آمده از بستنی‌های سنتی در الگوی الکتروفورزی دارای دو باند پروتئینی در ناحیه ۲۳/۵۹ و ۲۰/۷۹ بودند که از این لحاظ با جدایه استاندارد اختلاف داشتند. به نظر می‌رسد این جدایه‌ها به علت قرار گرفتن در شرایط مختلف دمایی نظیر پاستوریزاسیون و انجماد دچار تغییراتی در ویژگی‌های آنزیمی و پروتئین‌های ساختمانی شدند. بنابراین، لازم است در روند تشخیص این جدایه‌ها این نکات مد نظر قرار بگیرد، زیرا تغییر در پروفایل پروتئینی می‌تواند باعث تغییر در ویژگی‌های بیوشیمیایی شود و در نهایت، باعث ابهام در تشخیص شود. بررسی‌های انجام شده نشان داد بین جدایه‌های به‌دست آمده از بستنی و جدایه استاندارد تفاوت‌هایی وجود دارد. جدایه استاندارد دارای یک باند پروتئینی مشخص با وزن مولکولی ۲۲/۸۶ کیلودالتون بود ولی جدایه‌های به‌دست آمده بیشتر دارای وزن مولکولی ۲۳/۵۹ کیلودالتون و ۲۰/۷۹ کیلودالتون بودند که یک تفاوت کاملا مشخص بین این جدایه‌ها با جدایه استاندارد بود. این امر می‌تواند یک شاخص مهم برای جدایه‌هایی باشد که تحت تاثیر شوک‌های حرارتی قرار می‌گیرند. با توجه به وجود تفاوت‌هایی که این دو باند با جدایه استاندارد نشان می‌دهد شاید بتوان نتیجه گرفت، جدایه‌های باکتریایی که در مواد غذایی حضور دارند به علت آنکه تحت تاثیر فرآیندهای مختلف دمایی نظیر سرما و گرما قرار می‌گیرند، باکتری را وادار به تولید پروتئین‌ها و در برخی موارد تغییراتی در تولید آنزیم نموده که این امر باعث شده جدایه‌های حاصل دچار تغییراتی به علت شوک سرد شده که می‌تواند ویژگی‌های خاصی به جدایه‌ها جهت مقاومت در مقابل این عوامل مخرب بدهد. تفاوت در ویژگی‌های جدایه‌های گروه یک و دو با جدایه استاندارد نشان دهنده این مهم است.

www.SID.ir

Archive of SID

در مطالعاتی که توسط ندایی نیا[۲۵] و همکاران در شهر اصفهان انجام شد، نتایج مشابهی از تفاوت باندهای پروتئینی در جدایه‌های حاصل از بستنی و جدایه استاندارد وجود داشت که با یافته‌های این مطالعه مطابقت می‌کند (۱۹). بیشتر مطالعات انجام شده در مورد بررسی آلودگی نمونه‌های غذایی با رویکرد سلامت محور مد نظر قرار گرفته که نمونه‌هایی از آن آورده شده است ولی از لحاظ مولکولی نیاز است در این مورد بررسی‌های بیشتری در نقاط مختلف روی نمونه‌های غذایی مختلف انجام گیرد. مطالعات انجام شده در پاکستان توسط سومور[۲۶] نشان داد که نزدیک به ۶۰ درصد نمونه‌های شیر خام به *اشرشیاکلی* آلوده بود و این جدایه‌ها تحت تاثیر فرآیندهای حرارتی می‌تواند دچار ویژگی‌های متفاوتی شود که باعث تشخیص مشکل تر آن در محصول می‌شود (۹). در بررسی‌های انجام شده در شهرکرد توسط شاکریان[۲۷] و همکاران، ۲۰۰ نمونه بستنی سنتی از سطح شهرستان جمع‌آوری و از نظر آلودگی میکروبی آزمایش شد. از این تعداد ۱۰۰ نمونه آلودگی به باکتری‌های هوازی مزوفیل، ۱۱۴ نمونه آلودگی به *استافیلوکوکوس اورئوس*، ۹۹ نمونه آلودگی به *انتروباکتریاسه* و ۲ نمونه به *اشرشیاکلی* آلوده بودند (۲۰). در بررسی دیگری که در شهرستان مشهد انجام شد ۹۱ درصد از نمونه‌های بستنی سنتی دارای آلودگی میکروبی بودند، که از این تعداد ۸۴ درصد به باکتری خانواده *انتروباکتریاسه*، ۶۷ درصد به *استاف اورئوس* و ۱۱ درصد به *اشرشیاکلی* آلوده بودند (۱۹). در بررسی دیگری که در شهرستان گناباد توسط محمدزاده[۲۸] و همکاران روی بستنی سنتی انجام شده میزان ۳۲ درصد از نمونه‌ها آلوده به *اشرشیاکلی* بودند (۲۱). در بررسی دیگری که توسط پورمحمودی[۲۹] و همکاران در شهر یاسوج انجام شد، ۷۰ درصد مراکز تهیه و توزیع بستنی سنتی آلودگی میکروبی داشتند که از این مقدار ۱۷ درصد کل نمونه‌ها آلوده به *اشرشیاکلی* بودند (۱). نتایج پژوهش کریم[۳۰] و همکاران نیز نشان داد که در پنج منطقه تهران (شمال – جنوب – شرق – غرب و مرکز) ۶۳/۶۱ درصد در شمال، ۸۱/۰۸ درصد در جنوب، ۷۲/۹ درصد در شرق، ۷۵/۸ درصد در غرب و ۸۵/۷ درصد در مرکز به *اشرشیاکلی* آلوده بودند (۲۲). ارزیابی وضعیت فیزیکی- شیمیایی و میکروبی بستنی‌های سنتی تولید شده در شهر زاهدان توسط شادان[۳۱] و همکاران نشان داد که ۲ درصد نمونه‌ها در فصل بهار و ۵/۳ درصد نمونه‌ها در فصل تابستان آلوده بودند (۲۳). در بررسی دیگری در شیراز توسط شکر فروش[۳۲] و همکاران انجام شد، نشان داد که از ۷۰ واحد تولید و عرضه بستنی سنتی ۲۰ درصد نمونه‌ها به *اشرشیاکلی* آلوده بودند (۲۴). بررسی‌هایی انجام شده توسط صالحیان[۳۳] و همکاران در شهر ساری نشان داد که ۸۴ درصد بستنی‌های سنتی آلوده هستند، که آلودگی به *اشرشیا کلی* ۵۲ درصد را به خود اختصاص داده است (۲۵). بنابراین، بر اساس بررسی‌های انجام شده از ظاهر واحدهای تهیه، تولید و توزیع بستنی‌های سنتی نمی‌توان از بهداشتی بودن سلامت محصول اطمینان حاصل کرد. با توجه به موارد مطرح شده در مورد میزان آلودگی و اهمیت *اشرشیا کلی* به عنوان شاخص بهداشتی لازم است بررسی‌های بیشتر با رویکرد مولکولی به‌ویژه در زمینه غذایی انجام شود.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، واحد تحقیق و توسعه معاونت غذا و دارو، مدیریت و همکاران محترم بخش میکروب‌شناسی آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، آشامیدنی، آرایشی و بهداشتی که با حمایت‌های مالی و با در اختیار قرار دادن امکانات ما را در انجام این پژوهش یاری فرمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) Pourmahmoodi A., Mohammadi j., Mirzai A., Momeni Negad M., Afshar R. Epidemiological study of traditional ice cream in YASUJ. *Armaghan danesh* 2002; 8 (29): 59- 65. [In Persian].

(2) Black RE., Brown KH., Becker S., Alim ARMA., Merson MH. Contamination of weaning foods and transmission of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea in children in rural Bangladesh. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1982; 76 (2): 259- 64.

(3) Claeys WL., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control* 2013; 31 (1): 251- 62.

(4) Domenech E., Amoros JA., Escriche I. Effectiveness of prerequisites and the HACCP plan in the control of microbial contamination in ice cream and cheese companies. *Foodborne pathogens and disease* 2013; 10 (3): 222- 8. PubMed PMID: 23405882. Epub 2013.

(5) Jooste PJ., Anelich L., Motarjemi Y. Safety of Food and Beverages: Milk and Dairy Products. In: Motarjemi Y, editor. Encyclopedia of Food Safety. Waltham: Academic Press; 2014.

(6) Motarjemi Y., Moy GG., Jooste PJ., Anelich LE. Chapter 5 - Milk and Dairy Products. In: Motarjemi Y., Lelieveld H., editors. *Food Safety Management*. San Diego: Academic Press; 2014.

(7) Moyo SJ., Maselle SY., Matee MI., Longeland N. Identification of diarregenic *Esherchia Coli* isolated from. Infants and children in Dar es salam, Tanzania. *BMC Infectious Diseases* 2007; 7 (92): 1471-2334.

(8) Oliver SP., Jayarao BM., Almeida RA. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne pathogens and disease* 2005 Summer; 2 (2): 115- 29. PubMed PMID: 15992306. Epub 2005.

(9) Soomro AH., Arion MA., Khaskheli M., Bhutto B. Isolation of *Escherichia coli* from row milk productions in relation to public health sold under market conditions at tandojam. *Pakistam Journal of Nutrition* 2002; 1 (3): 151- 2.

(10) Hill, Bruce, Smythe, Betty, Lindsay, Denise, & Shepherd, Joanna. Microbiology of raw milk in New Zealand. International *Journal of Food Microbiology*, 2012; 157(2), 305-308.

(11) Hosseini Jazani N., hadizadeh O., Farzaneh H., Moloudizargari M. Synergistic antibacterial effects of β- Chloro- L- alanine and phosphomycin on urinary tract isolates of *E. coli*. *Biological Journal of Microorganism* 2013; 1 (4): 1- 6.

(12) Murray P. R., Baron E. J., Jorgensen J. H., Landry M. L., Pfaller M. A. (ed.), *Manual of clinical microbiology*. vol. 9. Washington, DC: ASM Press; 2007.

(13) Finegold SM, Martin WJ. *Determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents; assay of antimicrobial agents. Bailey and Scott's diagnostic microbiology*, 6th ed. United States: Mosby;1982.

(14) Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS, Bailey SS. Diagnostic microbiology 12th Edition: Mosby Elsevier, St. Louis, MO. 2007:778-81..

(15) Murray PR., Rosenthal KS., Pfaller MA. *Medical microbiology*. Netherlands: Elsevier Health Sciences; 2015.

(16) Schaad NW., Jones JB., Chun W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. Minessota: APS press, 2001.

(17) Sneath PHA., Sokal RR. Numerical Taxonomy: The Principles of Numerical Classification. San Francisco, CA, USA: Freeman, 1973.

(18) Laemmli UK. Cleavage of structural

www.SID.ir

Archive of SID

proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227 (5259): 680- 5.

(19) Nedaeinia R., Hejazi M., Javadi S., Feyzie M., Merasie MR. Statistical Study of the Rate of Contamination of Ice- cream made Traditionally and Industrially with *Escherichia coli* Bacteria and Optimizing Methods of Identifying *Escherichia coli* in Isfahan City in 2007: Isfahan University of Medical Sciences; 2009.

(20) Shakerian A., Karim G., Tajbakhsh E., Shafiei M. Investigating the microbial contamination of traditional ice creams in shahr- e- kord. *IJFST* 2006; 2 (4): 7- 21. [In Persian].

(21) Mohamadzadeh M., Ghahramani H., Mokhtarian D., Shariatifar N. The survey on the bacterial contamination of traditional ice cream produced in Gonabad city. *Ofogh- e- Danesh*; *Journal of Gonabad University of Medical Sciences* 2009 15 (1): 45- 52. [In Persian].

(22) Karim G., Razavilar V., Akhondzadeh A. Survey on the contamination of Traditional Iranian ice cream with important bacteria associated with foodborn infection and intoxication. *Journal Of Veterinary Reasearch* 1995; 50 (1 and 2). [In Persian].

(23) Shadan M., Juice F., Saffari F. Physicochemical and microbiological status of traditional ice cream Zahedan. *Journal of Materials Science and Engineering* (Doctor East) Winter 1381; 4 (4): 215- 22. [In Persian].

(24) Shekarforoush SS., Jafarpor B. Comparison of the Bacterial and Chemical Properties of Traditional Iranian Ice Cream Produced in Shiraz with Iran National Standard. *IJFST* 2006; 3 (2): 11- 7. [In Persian].

(25) Maryam Salehian., Ebrahim Salehifar., Mohammad Esfahanizadeh., Laleh Karimzadeh., Roghieh Rezaei., Mehdi Molanejad. Microbial Contamination in Traditional Ice cream and Effective Factors. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2013; 23 (99): 28- 33. [In Persian].

[1]- Fluorocult LMX Broth Modified (Merck 1.10620)
[2]- Kovac's reagent
[3]- Nutrient agar
[4]- ATCC1399 E. coli
[5]- Hucker
[6]- Catalase
[7]- Oxidase test
[8]- Schaad
[9]- Clark and Lubs medium
[10]- Merck, Germany
[11]- Christensen
[12]- Triple sugar Iron agar
[13]- cyto Matin GeneImmune, IRAN
[14]- Numerical analysis
[15]- UPGMA
[16]- NTSYSPC VER .2.02e
[17]- Stacking Gel
[18]- Separating Gel
[19]- Laemmmli
[20]- Vertical slab unit
[21]- LMW-SDS Marker Kit (14 kDa−97 KDa) (Uppsala, Sweden)
[22]- EMB
[23]- 2ME
[24]- Karim
[25]- Nedaeinia
[26]- Soomro
[27]- Shakerian
[28]- Mohamadzadeh
[29]- Pourmahmoodi
[30]- Karim, G
[31]- Shadan
[32]- Shekarforoush
[33]- Salehian

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of the *Escherichia coli (E.coli)* Strains based on protein profiles obtained from traditional Ice cream in Isfahan City

Maryam Ranjbar
M.Sc. of Food Science and Technology, Deputy of Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, maryamranjbar84@yahoo.com
Reza Nedaeinia *
Ph.D. of Medical Biotechnology, Deputy of Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, nedaeinr901@mums.ac.ir
Mohammad Goli
Ph.D. of Food Science and Technology, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, mgolifood@yahoo.com
Mostafa Manian
M.Sc. of Immunology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, mostafamanian@gmail.com
Mohammad Reza Meracy
Ph.D. of Epidemiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, mrmaracy@yahoo.co.uk
Mansour Feizi
M.Sc. of Toxicology, Laboratory control, Deputy of Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, manfeizi@yahoo.com
Nafiseh Kargaran
B.Sc. of Food Science and Technology, Department of Chemistry, Laboratory control, Deputy of Food and Drug, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran, nkargaran1347@yahoo.com

Abstract

Introduction: Bacterial strains present in food products undergo different thermal processes such as coldness and warmth. Such cases cause a shock in bacteria and force the bacteria to produce proteins and partly, develop a change in the production of enzyme. This can give the strain a special characteristic, knowledge of this characteristic will contribute to a timely and more precise identification.

Materials and methods: During this time more than 100 samples have been examined, out of which, 48 Indol positive isolation samples were examined by phenotypic tests and sodium dodecyle sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS- PAGE).

Results: – The results of numerical analysis of phenotypic characteristics and protein patterns showed that only 79% of the collected isolates (phenon 1 and 2) could be identified as *E.coli* compared with reference strains. *E.coli* strains from ice creams were showed some Variation in banding patterns. Major differences were observed in protein bands between 23.59 - and 20.79 - kDa molecular mass range which the isolates were compared with reference strains.

Discussion and conclusion: Our study concluded that food's bacterial strains are influenced by temperatures in different processes and also it could stimulate the production of proteins or change the enzymes. Therefore, The reason of taking care of the issues is that changes in the proteins' structures can lead to change in the biochemical properties, and finally this change can misguide us. Further research is being performed to characterize these atypical strains by molecular methods.

Key words: *Escherichia coli*, Ice cream, Whole-bacteria proteins profile

* Corresponding author
Received: July 26, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014

www.SID.ir