Archive of SID

ارزیابی همبستگی بین حضور ژن‌های کدکننده انتروتوکسین (SEB،SEA و SEC) در *استافیلوکوکوس اورئوس* با پارامترهای میکروبی و شیمیایی در پنیر محلی شهرستان کلات

شیما فرهی[۱]، **مسعود یاورمنش[۲]***

۱. گروه علوم و صنایع غذایی- میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکدهٔ علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان، قوچان، ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

محصولات لبنی سنتی یکی از مهم‌ترین منابع جهت رشد و تولید انتروتوکسین[۱] توسط گونه‌های باکتری *استافیلوکوکوس*[۲] می‌باشد. هدف از این تحقیق جداسازی باکتری *استافیلوکوکوس* و شناسایی مولکولی ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین[۳] (SEB،SEA و SEC) *استافیلوکوکوس اورئوس*[۴] و همچنین ارزیابی همبستگی احتمالی بین حضور ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین با پارامترهای[۵] میکروبی و شیمیایی در پنیر محلی شهرستان کلات بود. بدین منظور ۳۰ نمونه پنیر سنتی از شهرستان کلات تحت شرایط استریل[۶] جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها بر روی محیط کشت اختصاصی برد پارکر آگار[۷] کشت داده شد و با استفاده از تست کوآگولاز[۸]، شناسایی سرولوژیک[۹] انجام شد. به‌منظور شناسایی گونهٔ باکتری‌های جداشده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)[۱۰] بر اساس ژن ۱۶SrRNA انجام شد. همچنین ژن‌های انتروتوکسین سروتیپ[۱۱] SE در هر باکتری موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۰۰ درصد نمونه‌ها به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده می‌باشند. بررسی نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) نشان داد که ۷۰ درصد از نمونه‌های *استافیلوکوکوس ائوروس* جداشده، کد کنندهٔ یکی از انتروتوکسین‌ها هستند. درصد فراوانی ژن‌های SEA، SEB و SEC در *استافیلوکوکوس اورئوس‌های* جداشده به ترتیب ۳۶/۶ درصد، ۳۶/۶ درصد و صفر درصد بود. همچنین فقط ۳ درصد از باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، حاوی هر دو ژن SEA وSEB بودند. ضریب همبستگی حضور ژن‌های SEA و SEB با دامنهٔ pH به ترتیب ۰/۷۳۳ و ۰/۵۰۵، دامنهٔ نمک ۰/۵۳۶ و ۰/۶۹۰، دامنهٔ اسیدیته[۱۲] ۰/۷۹۷ و ۰/۹۲۴، دامنهٔ رطوبت ۰/۶۳۲ و ۰/۷۸۸، دامنهٔ شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها[۱۳] ۰/۹۳۲ و ۰/۹۳۵ و دامنهٔ شمارش *استافیلوکوکوس* ۰/۴۲۷ و ۰/۶۲۹ بود.

کلمات کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، پارامترهای میکروبی و شیمیایی، *پنیر محلی*، ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین، همبستگی.

* yavarmanesh@um.ac.ir
1 Enterotoxin
2 Staphylococcus
3 Enterotoxins Encoding Genes
4 Staphylococcus aureus
5 Parameters
6 Sterile
7 Baird- Parker Agar
8 Coagulase Test
9 Serologic
10 Polymerase Chain Reaction (PCR)
11 Serotype
12 Acidity
13 Microorganism

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس، عامل معمول ورم پستان در گاو در دنیا بوده و دارای اهمیت اقتصادی زیادی در صنعت لبنیات می‌باشد (۱). معالجهٔ ورم پستان ایجادشده توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط بالینی معمولاً ناامیدکننده بوده زیرا این باکتری سبب تخریب بافت کارتیه پستان[1] می‌شود و داروها نمی‌توانند از سرایت و نفوذ این باکتری جلوگیری کنند. ازاین‌رو، کنترل به‌موقع استافیلوکوکوس اورئوس می‌تواند تنها به تشخیص صحیح، بررسی ترشحات حیوانات آلوده، دارودرمانی در حین تولید شیر و برنامه‌های حذفی کمک کند (۲). *استافیلوکوکوس اورئوس* این توانایی را دارد که در تعداد زیادی از حیوانات و انسان‌ها بیماریزا کند. تولید کوآگولاز معیار اصلی است که در آزمایشگاه‌های بالینی میکروبیولوژی برای شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از آلودگی‌های انسانی استفاده می‌شود (۳). *استافیلوکوکوس اورئوس* همچنین فاگوسیتوز[2] و ایمنی بین سلولی را سرکوب می‌کند و آنزیمی[3] تولید می‌کند که بیشتر تیمارهای پنی‌سیلینی[4] را غیرفعال می‌نماید (۴).

شیر خام منبعی سرشار از *استافیلوکوکوس اورئوس* مخصوصاً در حالت پاستوریزاسیون[5] ناقص در محصولات لبنی است (۵). حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در شیر سبب به خطر افتادن سلامت انسان به جهت تولید توکسین‌های خطرناک می‌شود. از طرفی توکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۴۰°C تا ۴۵°C پایدارتر می‌شوند. پژوهشگران در سال ۱۹۸۲ گزارش کردند که تولید توکسین‌ها در دمای ۱۰°C تا ۴۶°C اتفاق می‌افتد. ازاین‌رو پاستوریزه‌کردن ناقص سبب افزایش تأثیر توکسین‌ها بر انسان می‌شود (۶). پنیر به‌عنوان قدیمی‌ترین فرآوردهٔ لبنی مورداستفادهٔ بشر، امروزه نقش بسزایی در سبد کالای خانوادهٔ ایرانی دارد. پنیر فرآورده‌ای است که متشکل از چربی و پروتئین شیر به همراه کلسیم و فسفری است که به صور مختلف با پروتئین شیر ترکیب‌شده است (۷). شهرستان کلات به دلیل واقع‌شدن در منطقهٔ کوهستانی، قطب کشاورزی استان خراسان رضوی محسوب می‌شود و در تولید انواع فرآورده‌های لبنی فعال است. یکی از فرآورده‌های لبنی تولیدشده در این شهرستان پنیر می‌باشد که از شیر خام گاو، گوسفند و یا مخلوط آن‌ها تهیه می‌شود.

به‌طورکلی پنیرهای محلی، از شیر خام و بدون افزودن باکتری‌های آغازگر ساخته‌شده و لذا فرآیند رسیدن در آن‌ها تنها توسط فلور طبیعی خود شیر صورت می‌گیرد، بنابراین کیفیت این نوع پنیرها بسیار متفاوت می‌باشد (۸). شیر تازهٔ گوسفند پس از دوشش تا دمای حدود ۴۰ °C±۵ °C گرم شده و رنت[6] تجاری حاصل از کپک *آسپرژیلوس نیجر واریته آواموری*[7] به میزان ۱ درصد در دمای ۳۰ °C ± ۵°C به آن افزوده می‌شود. سپس شیر، به‌منظور انعقاد و تشکیل دلمه، به مدت ۱ h در همین دما نگهداری می‌شود. پس از انعقاد، روی دلمه‌ها نمک پاشیده شده و به‌منظور خروج آب اضافی، داخل پارچه قرارگرفته و تحت‌فشار به مدت ۱ h داخل یخچال نگهداری می‌شوند. سپس دلمه‌ها از پارچه خارج‌شده و درون آب‌نمک ۱۵-۱۲ درصد قرار می‌گیرند. دلمه‌های تولیدی به مدت دو هفته داخل یخچال باقی‌مانده و سپس درون پوست بزغاله و آب‌نمک، در دمای یخچال تا پایان دورهٔ رسیدگی نگهداری می‌شوند (۹). با توجه به اینکه تمامی مراحل تهیهٔ پنیر سنتی در کارگاه‌های سنتی انجام می‌شود، لذا امکان سرایت پاتوژن‌ها[8] به‌خصوص به‌خصوص *استافیلوکوکوس ائوروس* به بافت نهایی پنیر افزایش می‌یابد. استافیلوکوکوس اورئوس یک گونهٔ باکتریایی بسیار مهم مولد مسمومیت غذایی در بسیاری از کشورها جهان می‌باشد. این باکتری طیف وسیعی از ترشحات سمی را تولید می‌نماید. در میان سموم تولیدشده

[1] Breast Cartier Tissue
[2] Phagocytosis
[3] Enzyme
[4] Penicillin Treatments
[5] Pasteurization

[6] Rent Enzyme
[7] *Aspergillus niger var. Awamori*
[8] Patogenes

www.SID.ir

Archive of SID

انتروتوکسین‌ها اهمیت بسزایی دارند (۱۰). انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* به ۱۸ سروتیپ سرولوژیک (از A تا U به جزء S، F و T) تقسیم‌بندی می‌شوند (۱۱). مطالعات انجام‌شده نشان می‌دهد که انتروتوکسین تولیدشده توسط سویه‌های مختلف استافیلوکوکی دارای ساختمان و توالی نسبتاً یکسانی می‌باشند (۱۲). اغلب این سروتیپ‌ها در برابر گرما و پروتئازهای[1] معده از قبیل پپسین[2] مقاوم هستند (۱۱). (۱۱). در این میان، انتروتوکسین SEA و SEB از مهم‌ترین عوامل اسهال و استفراغ می‌باشند (۱۳). انتروتوکسین نوع A استافیلوکوکی مهم‌ترین انتروتوکسین تولیدشده توسط استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت است. این سم عامل اصلی مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی در دنیا بوده و بیشترین مطالعات نیز در مورد آن انجام‌شده است (۱۲). در آمریکا و انگلستان بیشتر از ۶۰ درصد مسمومیت‌های غذایی مربوط به ژن‌های SEA و SEB است (۱۳). همچنین در مطالعه‌ای در ایران گزارش شد که ۹/۵ درصد مواد غذایی به *استافیلوکوکوس اورئوس* آلوده هستند (۱۴). *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث عفونت‌های جدی ازجمله آندوکاردیت[3]، آبسه[4] عمیق و استئومیلیت[5] در انسان می‌شود. معمولاً، تشخیص عامل بیماریزا وابسته به جداسازی باکتری از مرکز عفونت و یا کشت خون می‌باشد؛ اما در برخی موارد، دسترسی به مرکز عفونت ممکن است مشکل و یا خطرناک باشد (۱۵). درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها[6] سبب جلوگیری از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* در شرایط اینویترو[7] بر روی محیط کشت می‌شود (۱۶).

هدف از انجام این پژوهش ارزیابی همبستگی بین حضور ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین (SEA، SEB و SEC) در *استافیلوکوکوس اورئوس* با پارامترهای میکروبی و شیمیایی در پنیر محلی شهرستان کلات می‌باشد و همچنین تأثیرگذاری شرایط محیطی بر حضور و یا عدم حضور ژن‌های مذکور موردبررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه

تعداد ۳۰ نمونهٔ پنیر محلی از مراکز توزیع مواد لبنی سنتی در حوالی شهرستان کلات به شکل تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگهداری شد. نمونه‌ها در شرایط استریل و با استفاده از سرم فیزیولوژیک هموژن شده[8] و در محیط کشت آبگوشت اصلاح‌شدهٔ جیولیتی و کانتونی[9] (شرکت سیگما-آلدریچ، آمریکا)[10] در دمای $37\ ^{\circ}C$ به مدت ۲۴ h گرم‌خانه گذاری شد. پس از ایجاد کدورت در محیط کشت مایع، کشت مجدد روی محیط کشت اختصاصی برد پارکر آگار حاوی زردهٔ تخم‌مرغ (شرکت سیگما-آلدریچ، آمریکا)انجام شد (۱۷).

آزمون‌های میکروبی

شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از استاندارد ملی ایران به شمارهٔ ۵۴۸۴ انجام شد (۱۸). آزمون کوآگولاز با استفاده از پلاسمای سیتراتهٔ خرگوش[11] (شرکت مرک، آلمان)[12] روی کلونی‌های مثبت محیط کشت برد پارکر آگار انجام شد. همچنین جستجو، شناسایی و شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۳-۶۸۰۶ انجام شد (۱۹).

آزمون‌های شیمیایی

به‌منظور برآورد پارامترهای شیمیایی از قبیل رطوبت، اسیدیته، pH و نمک به ترتیب از استانداردهای ملی ایران به شمارهٔ ۱۷۵۳، ۲۸۵۲ و ۱۸۰۹ استفاده شد (۲۲-۲۰).

[1] Protease
[2] Pepsin
[3] Endocarditis
[4] Abscess
[5] Osteomyelitis
[6] Antibiotics
[7] Invitro

[8] Homogenized Physiologic Serum
[9] Modified Giolitti and Cantoni Broth
[10] Sigma-Aldrich Corporation, The United States
[11] Rabbit Citrate Plasma
[12] Merck Company, Germany

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

ماده وراثتی (DNA) میکروارگانیسم‌های مشکوک به *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد. ابتدا هر کلونی[1] به داخل میکروتیوب[2] حاوی ۱۰۰ µL[3]، آب مقطر دو بار تقطیر استریل منتقل گردید. بید شیشه‌ای استریل، به میکروتیوب اضافه شد و برای مدت ۵ min در فریزر ۲۰°C- قرار داده شد. سپس به‌شدت ورتکس[4] شده و سوسپانسیون[5] میکروبی به یک میکروتیوب جدید انتقال یافت. میکروتیوب‌های حاصل در دمای ۷۰ °C به مدت ۲۰min حرارت داده شدند و سپس به مدت ۱۰ min در ۱۳۰۰۰g سانتریفوژ[6] گردیدند. به‌اندازه ۵۰µL از فاز بالایی یا سوپرناتانت[7] فاقد سلول به‌عنوان DNA استخراجی از سطح بالایی محلول برداشته شد و به درون یک میکروتیوب جدید انتقال یافت و به پلت باقیمانده، ۵۰ µL آب مقطر دو بار تقطیر افزوده و مراحل فوق مجدداً تکرار شد. سپس ۵۰ µL از سوپرناتانت حاصل، به سوپرناتانت قبلی افزوده شد و مجموعهٔ حاصل به‌منظور عاری نمودن DNA استخراجی از هرگونه آلودگی پروتئینی، به مدت ۱۰ min و در ۱۳۰۰۰ g سانتریفوژ گردید. به‌اندازه ۵۰µL-۴۰ از محلول بالایی، به‌عنوان DNA نسبتاً خالص استخراجی، در نظر گرفته شد (۲۳). غلظت محصول استخراج DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ[8] مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور شناسایی گونهٔ *استافیلوکوکوس اورئوس* از پرایمرهای[9] اختصاصی ۱-sa۴۴۲ و ۲-sa۴۴۲ جهت شناسایی ژن ۱۶SrRNA استفاده شد (۲۴). همچنین جهت شناسایی ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین SEC، SEB و SEA در باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* سه جفت پرایمر انتخاب شد (۲۵) (جدول ۱). بررسی همولوژی[10] و نحوهٔ اتصال پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار پرایمر پریمر ۵[11] و همچنین بانک جهانی ژن[12] انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از کیت[13] واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) (شرکت آمپلیکون، دانمارک)[14] انجام شد. برای این منظور، ۱ µL از DNA مجهول، به همراه ۱۰ pmol[15] پرایمر اختصاصی و ۱۱µL آب مقطر استریل به ۱۲ µL مخلوط کیت واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) اضافه شد. نمونه‌ها به دستگاه ترموسایکلر، آلمان[16] منتقل و با استفاده از برنامهٔ حرارتی (واسرشت‌سازی ۲min در **C** ° ۹۴، اتصال min ۲ در **C** ° ۵۳ و بسط min ۱ در **C** ° ۷۲ برای ۳۵ سیکل، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای **C** ° ۹۴ به مدت min ۳ و یک مرحله بسط نهایی به مدت min ۵ در **C** ° ۷۲ تکثیر شدند. به‌منظور تکثیر ژن ۱۶SrRNA از برنامهٔ دمایی واسرشت‌سازی sec ۳۰ در **C** ° ۹۴، اتصال sec ۲۰ در **C** ° ۵۸ و بسط sec ۳۰ در **C** ° ۷۲ برای ۳۵ سیکل، یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای **C** ° ۹۴ برای min ۵ و یک مرحله بسط نهایی به مدت min ۱۰ در **C** ° ۷۲ استفاده شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بر روی ژل آگارز ۲ درصد برده شد و رنگ‌آمیزی آن با استفاده از سایبرگرین[17] (شرکت سیگما-آلدریچ، آمریکا) صورت گرفت. مارکر[18] مورداستفاده در الکتروفورز[19] مارکر M100(+) (ترمو فیشر، آمریکا)[20] بود. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به‌منظور تائید نهایی و توالی یابی به شرکت ماکروژن کرهٔ جنوبی[21] جهت ارسال گردید.

[1] Colony
[2] Micro Tube
[3] Microliter
[4] Vortex
[5] Suspension
[6] Centrifuge
[7] Supernatant
[8] Nano-drop 2000-Thermo, USA
[9] Primers

[10] Homology
[11] Primer Premier 5
[12] National Center for Biotechnology Information (NCBI)
[13] Kit
[14] Ampliqon Company, Denmark
[15] Picomole
[16] T-Personal, Germany
[17] SYBR Green
[18] Marker
[19] Electrophoresis
[20] Thermo Fisher Scientific
[21] Microgen, South Korea

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی همبستگی

به‌منظور بررسی همبستگی بین حضور ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین با پارامترهای میکروبی و شیمیایی از نرم‌افزار مینی‌تب[1] نسخهٔ ۱۴ استفاده شد. هدف از بررسی همبستگی مطالعهٔ رابطهٔ بین متغیرهای مستقل این مطالعه (دامنهٔpH، نمک، اسیدیته و رطوبت) و متغیرهای وابسته (انتروتوکسین‌های SEB,SEA و SEC) بود.

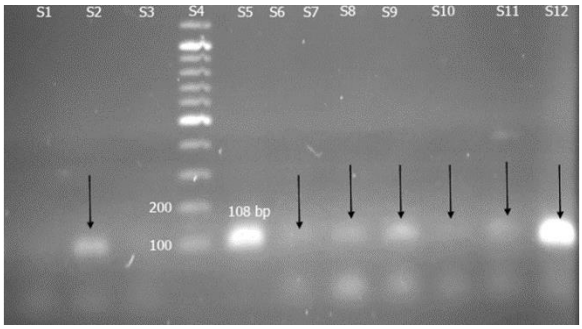
نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

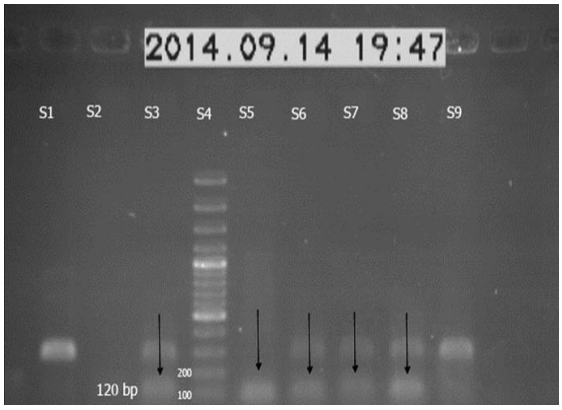
الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای sa۴۴۲-۱ و sa۴۴۲-۲ نشان داد که از ۳۰ نمونه پنیر محلی بررسی‌شده، تعداد ۲۱ نمونه یا ۷۰ درصد از نمونه‌های *استافیلوکوکوس ائوروس* جداشده، کد کنندهٔ یکی از انتروتوکسین‌ها هستند (شکل۲). حضور قطعه با طول ۱۰۸ جفت باز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و همچنین نتیجهٔ توالی یابی نشان از صحت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) بود. علاوه بر این، وجود باند اختصاصی نشان از اختصاصیت بالای پرایمرها برای تکثیر قطعهٔ هدف بود. ژن ۱۶SrRNA یکی از مهم‌ترین ژن‌های محافظت‌شده در باکتری‌ها برای شناسایی در حد گونه می‌باشد. پژوهشگران با استفاده از این ژن، *استافیلوکوکوس اورئوس* در فرآورده‌های مختلف لبنی از قبیل شیر، پنیر، کره و بستنی را ردیابی کردند (۲۶).

شناسایی ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین‌های SEA، SEB و SEC

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای SEA نشان داد که از ۳۰ نمونهٔ پنیر محلی بررسی‌شده، تعداد ۱۱ نمونه یا ۳۶/۶ درصد انتروتوکسین A را تولید می‌کنند (شکل۲). حضور قطعه با طول ۱۲۰ جفت باز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و همچنین نتیجهٔ توالی یابی برای قطعهٔ SEA نشان از صحت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) داشت. الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای SEB نشان داد که تعداد ۱۱ نمونه یا ۳۶/۶ درصد از پنیرهای محلی به انتروتوکسین B آلوده بودند (شکل۳). حضور قطعه با طول ۴۷۸ جفت باز بر روی ژل آگارز ۲ درصد و همچنین نتیجهٔ توالی یابی برای قطعهٔSEB نشان از صحت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) داشت. همچنین، الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از پرایمرهای SEC نشان داد که هیچ نمونه‌ای به انتروتوکسینSEC آلوده نبوده است.



شکل(۱) الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ژن ۱۶SrRNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد. نمونهٔ S_1: کنترل منفی، نمونهٔ S_2، S_3 و S_5-S_{12}، مربوط به نمونه‌های مجهول مورد آزمایش، S_4: مارکر DNA +۱۰۰



شکل(۲) الکتروفورز محصولات PCR ژن SEA بر روی ژل آگارز ۲ درصد. نمونه‌های S_1، S_3 و S_5-S_9 مربوط به نمونه‌های مجهول مورد آزمایش، S_2: کنترل منفی و S_4: مارکر DNA+۱۰۰

[1] Mini Tab

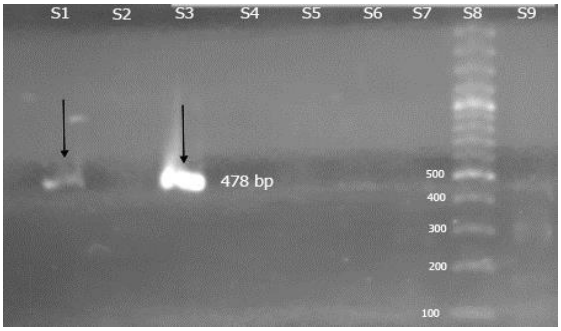
www.SID.ir

Archive of SID

همبستگی پارامترهای میکروبی و شیمیایی با ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین‌ها

بررسی نتایج پارامترهای میکروبی نشان داد که با افزایش دامنهٔ شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها امکان حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر شده و به دنبال آن تولید انتروتوکسین‌ها افزایش‌یافته است. برآورد ضریب همبستگی ۰/۹۳۲ و ۰/۹۵۸ به ترتیب برای ژن‌های SEA و SEB نشان‌دهندهٔ همبستگی مثبت بین این دو متغیر است (جدول ۲). برآورد همبستگی برای دامنهٔ شمارش *استافیلوکوکوس* و ژن‌های SEA و SEB به ترتیب ۰/۴۵۷ و ۰/۶۲۹ بود. این نتایج همچنین نشان‌دهندهٔ همبستگی مثبت میان حضور *استافیلوکوکوس* و *استافیلوکوکوس* توکسین‌زا است (جدول ۳).

بررسی نتایج همبستگی پارامترهای شیمیایی نشان داد که همبستگی حضور ژن‌های SEA و SEB با دامنهٔ pH به ترتیب ۰/۷۳۳ و ۰/۵۰۵، دامنهٔ نمک ۰/۵۳۶ و ۰/۶۹۰، دامنهٔ اسیدیته ۰/۷۹۷ و ۰/۹۲۴ و دامنهٔ رطوبت ۰/۶۳۲ و ۰/۷۸۸ مثبت بود. بهترین دامنهٔ pH برای فعالیت ژن SEA، ۶/۲-۵/۶ و برای ژن SEB، ۶/۵- ۶/۲ (جدول ۴) و بهترین دامنهٔ نمک برای فعالیت ژن SEB وSEA، ۲/۲-۱/۲ بود (جدول ۵). پژوهشگران گزارش کردند که بهترینpH برای رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و تولید توکسین‌ها ۶/۸ می‌باشد. آن‌ها معتقد بودند که ۶ h ابتدایی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس*، حیاتی‌ترین زمان جهت ممانعت از رشد می‌باشد (۲۷).



شکل(۳) الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ژن SEB بر روی ژل آگارز ۲ درصد.
نمونه‌های S_1-S_7 مربوط به نمونه‌های مجهول، S_8: مارکر DNA +۱۰۰، S_9: کنترل منفی

جدول (۱) توالی پرایمرهای مورداستفاده

ژن	پرایمر	سایز (bp)	توالی پرایمر ('5'3)	منبع
۱۶SrRNA	(F)sa۴۴۲-۱	۱۰۸	AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG	مارتینیو[1]، ۱۹۸۶
	(R)sa۴۴۲-۲		CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA	
SEA	SEA-F	۱۲۰	TTG GAA ACG GTT AAA ACGAA	بتلی[2]، ۱۹۸۸
	SEA-R		GAACCTTCCCATCAAAAACA	
SEB	SEB-F	۴۷۸	TCGCATCAAACTGACAAACG	جونز[3]، ۱۹۸۶
	SEB-R		GCAGGTACTCTATAAGTGCC	
SEB	SEC-F	۲۵۷	GACATAAAAGCTAGGAATTT	بویچ[4]، ۱۹۸۷
	SEC-R		AAATCGGATTAACATTATCC	

[1] Martinio
[2] Betly
[3] Jones
[4] Bovich

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین بهترین دامنهٔ اسیدیته برای حضور ژن SEB و SEA ۰/۴-۰/۵۵ (جدول ۶) و بهترین دامنهٔ رطوبت برای حضور ژن SEB و SEA ۵۴/۱-۵۶/۱ بود (جدول۷). استفاده از مایع پنیر در غلظت‌های بالاتر سبب کاهش pH و تغییر در بافت پنیر و افزایش اسیدیته می‌شود. نتایج این تحقیق نشان داد، پنیرهایی که دارای pH نزدیک به pH ذاتی شیر خام هستند، از شانس آلودگی بالاتری برخوردارند. انتظار می‌رود که در این پنیرها، مرحلهٔ تخمیر به‌خوبی صورت نگرفته باشد. در دامنهٔ نمک ۸/۲- ۷/۲، دامنهٔ اسیدیته ۰/۷-۰/۵۵ و دامنهٔ رطوبت ۴۸/۱-۴۶/۱ رشد *استافیلوکوکوس ائوروس* مشاهده نشد. استفاده از نمک در غلظت‌های بالا به جهت ممانعت از تغییر چربی و پروتئین و جلوگیری از فساد، سبب کاهش رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود (۲۸). هرچند که با توجه به نقش نمک در افزایش احتمال بروز بیماریزا قلبی و عروقی، سازمان بهداشت جهانی توصیه‌هایی را مبنی بر کاهش میزان نمک در رژیم غذایی در دستور کار خود قرار داده است.

جدول(۲) برآورد میزان همبستگی دامنهٔ شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها و حضور ژن‌های توکسین‌زا

دامنهٔ شمارش کلی میکروارگانیسم‌ها	حضور ژن استافیلوکوکوس اورئوس	حضور ژن sea	حضور ژن seb	حضور ژن sec
۴-۴/۵	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰	۰
۴/۵-۵	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰	۰
۵-۵/۵	۰/۱۶۶	۰/۰۶۶	۰/۰۳۳	۰
۵/۵-۶	۰/۱	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰
۶-۶/۵	۰/۲۳۳	۰/۱	۰/۱	۰
۶/۵-۷	۰/۳۳۳	۰/۱	۰/۲	۰
۷-۷/۵	۰/۱	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰
ضریب همبستگی		۰/۹۳۲	۰/۹۵۸	*
کوواریانس		۰/۰۰۳۲۶۵۱۰	۰/۰۰۷۵۱۵۳۳	۰

جدول(۳) برآورد میزان همبستگی دامنهٔ شمارش استافیلوکوکوس و حضور ژن‌های توکسین‌زا

دامنهٔ شمارش استافیلوکوکوس	حضور ژن استافیلوکوکوس اورئوس	حضور ژن sea	حضور ژن seb	حضور ژن sec
۳/۶-۴	۱/۳۳	۰/۰۶۶	۰/۰۶۶	۰
۴-۴/۴	۰/۱	۰	۰/۰۶۶	۰
۴/۴-۴/۸	۰/۱۶۶	۰/۰۶۶	۰/۰۳۳	۰
۴/۸-۵/۲	۰	۰/۰۳۳	۰	۰
۵/۲-۵/۶	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰
۵/۶-۶	۰/۴	۰/۱	۰/۱	۰
۶-۶/۴	۱/۳۳	۰/۰۶۶	۰/۰۳۳	۰
ضریب همبستگی		۰/۴۵۷	۰/۶۲۹	*
کوواریانس		۰/۰۰۸۸۲۲۸۳	۰/۰۰۴۳۳۴۰۵	۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول(۴) برآورد میزان همبستگی دامنه‌های مختلف pH و حضور ژن‌های توکسین‌زا

دامنهٔ pH	حضور ژن استافیلوکوکوس اورئوس	حضور ژن sea	حضور ژن seb	حضور ژن sec
۵-۵/۳	۰/۰۶۶	۰	۰	۰
۵/۳-۵/۶	۰/۲	۰/۱۳۳	۰/۱	۰
۵/۶-۵/۹	۰/۲۳۳	۰۱	۰/۱۳۳	۰
۵/۹-۶/۲	۰/۳۳۳	۰/۱	۰/۶۶	۰
۶/۲-۶/۵	۰/۱۶۶	۰/۳۳	۰/۱	۰
ضریب همبستگی		۰/۷۳۳	۰/۵۰۵	*
کوواریانس		۰/۰۰۳۹۰۶۱۰	۰/۰۰۲۴۸۱۶۵	۰

جدول(۵) برآورد میزان همبستگی دامنه‌های مختلف نمک و حضور ژن‌های توکسین‌زا

دامنهٔ نمک	حضور ژن استافیلوکوکوس اورئوس	حضور ژن sea	حضور ژن seb	حضور ژن sec
۰/۲-۱/۲	۰/۱۳۳	۰/۰۳۳	۰/۱	۰
۱/۲-۲/۲	۰/۲۳۳	۰/۱	۰/۱۳۳	۰
۲/۲-۳/۲	۰/۱۶۶	۰/۰۳۳	۰/۰۶۶	۰
۳/۲-۴/۲	۰/۲	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰
۴/۲-۵/۲	۰/۱	۰/۱۰	۰/۰۳۳	۰
۵/۲-۶/۲	۰/۰۳۳	۰	۰/۰۳۳	۰
۶/۲-۷/۲	۰/۱	۰/۰۶۶	۰	۰
۷/۲-۸/۲	۰/۰۳۳	۰	۰	۰
ضریب همبستگی		۰/۵۳۶	۰/۶۹۰	*
کوواریانس		۰/۰۰۱۵۴۷۶۷	۰/۰۰۲۳۶۹۰۷	۰

جدول(۶) برآورد میزان همبستگی دامنه‌های مختلف اسیدیته و حضور ژن‌های توکسین‌زا

دامنهٔ اسیدیته	حضور ژن استافیلوکوکوس اورئوس	حضور ژن sea	حضور ژن seb	حضور ژن sec
۰/۱-۰/۲۵	۰/۴	۰/۱	۰/۱۶۶	۰
۰/۲۵-۰/۴	۰/۳	۰/۱	۰/۱	۰
۰/۴-۰/۵۵	۰/۲	۰/۱۳۳	۰/۱۳۳	۰
۰/۵۵-۰/۷	۰/۰۳۳	۰	۰	۰
۰/۷-۰/۸۵	۰/۰۳۳	۰	۰	۰
ضریب همبستگی		۰/۷۹۷	۰/۹۲۴	*
کوواریانس		۰/۰۰۸۰۶۶۱۰	۰/۰۱۱۴۷۸۳۰	۰

www.SID.ir

Archive of SID

جدول(۷) برآورد میزان همبستگی دامنه‌های مختلف رطوبت و حضور ژن‌های توکسین‌زا

دامنهٔ رطوبت	حضور ژن استافیلوکوکوس اورئوس	حضور ژن sea	حضور ژن seb	حضور ژن sec
۴۲/۱-۴۴/۱	۰/۰۳۳	۰	۰	۰
۴۴/۱-۴۶/۱	۰	۰	۰	۰
۴۶/۱-۴۸/۱	۰	۰	۰	۰
۴۸/۱-۵۰/۱	۰/۱۳۳	۰/۱	۰	۰
۵۰/۱-۵۲/۱	۰/۰۳۳	۰	۰/۰۳۳	۰
۵۲/۱-۵۴/۱	۰/۱۶۶	۰/۱	۰/۰۳۳	
۵۴/۱-۵۶/۱	۰/۲۳۳	۰/۰۶۶	۰/۱۳۳	
۵۶/۱-۵۸/۱	۰/۱۶۶	۰	۰/۱	۰
۵۸/۱-۶۰/۱	۰/۰۳۳	۰	۰	۰
۶۰/۱-۶۲/۱	۰/۱۳۳	۰/۰۳۳	۰/۱	۰
۶۲/۱-۶۴/۱	۰/۰۶۶	۰/۰۶۶	۰	۰
ضریب همبستگی		۰/۶۳۲	۰/۷۸۸	*
کوواریانس		۰/۰۰۲۰۹۷۳۹	۰/۰۳۱۳۲۸۴	۰

نتیجه‌گیری

پنیرهای سنتی تولیدی در کارگاه‌های لبنی به جهت فقدان مکانیزاسیون[1] مسیر انجام کار، دارای مشکلات عدیده‌ای است. معمولاً ترکیب مواد در این کارگاه‌ها تجربی بوده، لذا پنیرهای تولیدی در یک کارگاه نیز ازنظر پارامترهای میکروبی و ترکیبات شیمیایی باهم متفاوت هستند. شیر خام به‌عنوان مادهٔ مغذی، محیط مناسبی جهت رشد باکتری‌ها محسوب می‌شود. از طرفی قرار گرفتن این شیر در محیطی که دیگر فرآورده‌های لبنی در آنجا تهیه می‌شود، انتقال آلودگی را از طریق افراد و حشرات نیز افزایش می‌دهد. استفاده از شیر خام و عدم انجام فرآیند پاستوریزاسیون در تهیهٔ پنیر محلی، سبب باقی ماندن باکتری‌های بیماریزا همچون *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌گردد که این امر به‌نوبهٔ خود سبب افزایش تولید انتروتوکسین‌ها می‌شود. همان‌طور که در نتایج گزارش‌شده است، همبستگی مثبت و بالای تعداد میکروارگانیسم‌ها با میزان تولید انتروتوکسین به سبب فراهم شدن مواد مغذی لازم برای رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. همچنین همبستگی مثبت رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین حضور ژن‌های انتروتوکسین با پارامترهای شیمیایی نشان از اهمیت شرایط تهیهٔ پنیر و اثرگذاری آن بر حضور احتمالی انتروتوکسین دارد. لذا نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که تولید پنیر در شرایط سنتی به علت استفاده از شیر خام امکان حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و انتروتوکسین حاصل از آن را افزایش می‌دهد. در این پژوهش، تنها حضور ژن‌های کد کنندهٔ انتروتوکسین، مدنظر بوده و چون حضور ژن دال بر تولید انتروتوکسین نیست لذا جهت ارزیابی دقیق‌تر انجام تحقیقات بعدی موردنیاز می‌باشد.

[1] Mechanization

منابع

1-Devriese LA, De Keyser H. Prevalence of different species of coagulase-negative staphylococci on teats and in milk samples from dairy cows. Journal of Dairy Research 1980; 47, 151-158.

2-De Oliveira AP, Watts JL, Salmon SA and Aarestrup FM. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis in Europe and the United States. Journal of Dairy Science 2000; 83, 855-862.

www.SID.ir

Archive of SID

3-Pantucecek R, Cotz F, Dosker J and Rosypal S. Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and other coagulase-positive Staphylococcus species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. International Journal of Systematic Bacteriology 1996; 46, 216-222.

4-Osteras O, Martin SW and Edge VL. Possible risk factors associated with penicillin-resistant strains of Staphylococcus *aureus* from bovine subclinical mastitis in early lactation. Journal of Dairy Science 1999; 82, 927-938.

5-Balaban N and Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. International Journal of Food Microbiology 2000; 61, 1–10.

6-Smith JL, Buchanan RL and Palumbo SA. Effect of food environment on staphylocaccal enterotoxin synthesis: a review. Journal of Food Protection 1982; 46, 545-555.

7-Hesari J, Ehsani MR, Khosroshahi A. and McSweeney PLH. Contribution of rennet and starter to proteolysis in Iranian UF white cheese. Le Lait 2006; 86, 291-302.

۸-هاشمی مجید، طباطبائی یزدی فریده، یاورمنش مسعود، میلانی الناز و پاسبان آتنا. تاثیر نوع رنت، ظرف نگهداری و زمان رسیدن بر ویژگی‌های میکروبی و فیزیکوشیمیایی پنیر حلی کردی فصلنامه علوم و صنایع غذایی ۱۳۹۱؛ ۳۷ (۹)، ۱۴۷-۱۳۵.

۹-میلانی الناز، شهیدی فخری، مرتضوی سید علی، وکیلی سید علیرضا. تأثیر مدت‌زمان رسیدگی بر پروفیل اسیدهای چرب و آمینواسید آزاد پنیر محلی کردی. نشریهٔ پژوهش-های علوم و صنایع غذایی ایران ۱۳۹۳؛ ۳ (۱۰)، صفحات ۱۹۵-۱۸۸.

۱۰-اثنی‌عشری مهرداد، شایق جلال، نصرالهی عمران آیتا... . مطالعه میزان شیوع ژن‌های انتروتوکسین‌های معمول در استافیلوکوکوس اورئوس‌های جداشده از شیر گاومیش‌های شهرستان تبریز به روش PCR Multiplex. بهداشت مواد غذایی ۱۳۹۱؛ ۲ (۲)، ۶۸-۶۱.

11-Paciorek ML, Kochman M, Piekarska K, Grochowska A, Windyg B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. International Journal of Food Microbiology 2007; 117, 319-323.

۱۲-سعادتی مجتبی، براتی بابک، شیرازی مهدی. شناسایی ژن‌های sec, sea و seq استافیلوکوکوس از نمونه‌های ناقلین سالم. دوفصل‌نامهٔ طب جنوب ۱۳۸۸؛ ۱ (۱۲)، ۱۶-۸.

13-Kluytmans JAJW and Wertheim HFL. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and prevention of nosocomial infections. Journal of Infection 2005; 33, 3-7.

14-Eshraghi S, Salehipour Z, Pourmand MR, Rahimi Forushani A, Zahraei Salehi MT, Agha Amiri S, Bakhtyari R, Abedi Mohtasab TP, Mardani N, Seyed Amiri S and Soltan Dallal MM. Prevalence of tst, entC, entA and, entA/Cgenes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from different foods. Tehran University Medical Journal 2009; 7, 470-476.

15-Murray PR, Rosenthal KS and Pfaller MA. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro. Elsevier 2006; 979.

16-Kuźma K, Malinowski E, Lassa H and Kłossowska A. Specific Detection of *Staphylococcus aureus* by PCR in Intramammary Infection. Jornal of Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy 2003; 47, 183-190.

17-Bhatia A and Zahoor S. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: a review. Journal of Clinical and Diagnostic Research 2007; 2, 188-197.

۱۸-شیر و فرآورده‌های آن– روش شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌ها در ۳۰ درجهٔ سلسیوس/ ۵۴۸۴/ استاندارد ملی ایران/ چاپ اول/۱۳۸۱.

http://www.isiri.gov.ir/portal/files/std/5484.htm

۱۹-میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام– روش جامع برای شمارش استافیلوکوکوس کواگولاز مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و سایر گونه‌ها)– قسمت سوم، جستجو، شناسایی و شمارش به شیوهٔ محتمل‌ترین تعداد (MPN) برای تعداد کم میکروارگانیسم/ ۳-۶۸۰۶/ استاندارد ملی ایران/ چاپ اول/۱۳۸۵.

http://www.isiri.gov.ir/portal/files/std/6806-3.PDF

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰-پنیر و پنیرهای فرآیندشده، تعیین مقدار ماده خشک کل (روش مرجع)/۱۷۵۳/استاندارد ملی ایران/ تجدیدنظر اول/۱۳۸۱.

http://www.isiri.gov.ir/portal/files/std/1753.doc

۲۱-شیر و فراورده‌های آن- تعیین اسیدیته و pH- روش آزمون/۲۸۵۲/ استاندارد ملی ایرن/ تجدیدنظر اول/ ۱۳۸۵.

http://isiri.org/Portal/file/?74305/2852.pdf

۲۲-تعیین مقدار کلرور پنیر (روش مرجع)/۱۸۰۹/
استاندارد ملی ایرن/ چاپ اول/ ۱۳۵۶.

http://www.isiri.gov.ir/portal/files/std/1809.htm

23-Alegría A, Alvarez-Martín P, Sacristán N, Fernández E, Delgado S, Mayo B. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology 2009؛ 136(1), 44-51.

24-Martineau F, Picard F J, Roy P H, Ouellette M, and Bergeron M G. Species Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology 1997; 36, 618-623.

25-Johnson W M, Tyler S D, Ewan E P, Ashton F E, Pollard D R, and Rozee K R. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Microbiology 1990; 29, 426-430.

26-Gücükoğlu A, OnurKevenk T, Uyanik T, Çadirci Ö, Terzi G. and Alişarli M. Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Raw Milk and Dairy Products by Multiplex PCR. Journal of Food Science 2012; 77, 620–623.

27-Alomar J, Lebert A. and Montel MC. Effect of Temperature and pH on Growth of *Staphylococcus aureus* in Co-Culture with Lactococcusgarvieae. Current Microbiology 2008; 56, 408-412.

28-Choobkar N, Soltani M, Ebrahimzadeh Mousavi HA, AkhonzadehBasti A. and Matinfar A. Effect of Zatariamultiflora Boissessential oil on the growth of *Staphylococcus aureus* in the light salted fillets of silver carp (Hypo–phthalmich–thysmolitrix). Iranian Journal of Fisheries Science 2010; 9, 352-359.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of the correlation among the presence of enterotoxins encoding genes (SEA, SEB and SEC) of *Staphylococcus aureus* with microbial and chemical parameters in local cheese

Shima Farahi[1], **Masoud Yavarmanesh[2*]**

1. Department of Food Sciences and Industries, Faculty of Food Sciences and Industries, Quchan Azad University, Quchan, Iran

2. Department of Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract

Local dairy products are one of the most important sources of growth and production of enterotoxin by species of Staphylococcus bacteria. Hence, the aim of this study was to isolate Staphylococcus bacteria and identify *Staphylococcus aureus* enterotoxins encoding genes by molecular methods (SEA, SEB and SEC) as well as determining any probable correlation among the presence of the enterotoxin encoding genes with microbial and chemical parameters in Kalat city local cheese. For this purpose, 30 samples of local cheese were collected and transferred from Kalat city to the laboratory under sterile conditions. Samples were then cultured on Bread Parker Agar Medium and serological identification was done using coagulase method. PCR was performed according to16SrRNA gene in order to identify the species of isolated bacteria. Also, the SE serotype enterotoxin genes in each bacterium were examined. Results showed that 100% of samples are contaminated with *Staphylococcus aureus*. Also, PCR results showed that 70% of the isolated *Staphylococcus aureus* produce one of the enterotoxins. The frequency of SEA, SEB and SEC genes in the isolated *Staphylococcus aureus*, were respectively 36.6%, 36.6% and 0%. Also, only 3% of *Staphylococcus aureus* were containing both SEA and SEB genes. The correlation coefficients of the presence of genes SEA and SEB with a range of pH, salt, acidity, moisture%, mesophilic bacteria total count and enumeration of *Staphylococcus aureus* were0.733-0.505, 0.536-0.690, 0.797-0.924, 0.632-0.788, 0932-0935 and 0.427-0.629, respectively.

Keywords: Correlation, Enterotoxins encoding genes, Microbial and chemical parameters, Local cheese, *Staphylococcus aureus*.

* yavarmanesh@um.ac.ir

www.SID.ir