

## جدا سازی و خالص سازی یک باکتریوسین مقاوم به اشعه‌ی ماورای بنفش از سویه‌ی DSH20 انتروکوک فاسیوم دارای اثر ضد باکتری لیستریا منوسیتوژنز

داریوش شکری<sup>۱</sup>، سعیده زاغیان<sup>۲</sup>، دکتر حسین فاضلی<sup>۳</sup>، سینا مباشری زاده<sup>۴</sup>، دکتر بهروز عطایی<sup>۵</sup>

### مقاله پژوهشی

#### چکیده

**مقدمه:** علاوه بر مطرح بودن باکتریوسین‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم، کاربرد رایج آن‌ها به عنوان ماده‌ی نگه‌دارنده و محافظ در صنایع غذایی است. هدف از این مطالعه، جدا سازی و خالص سازی باکتریوسین‌های مقاوم به اشعه‌ی ماورای بنفش (Ultraviolet یا UV) از سویه‌های انتروکوک بود که بر ضد باکتری لیستریا منوسیتوژنز فعال باشند.

**روش‌ها:** سویه‌های باکتری انتروکوک از نمونه‌های مختلف بالینی جدا سازی و شناسایی شدند و تولید باکتریوسین در آن‌ها علیه سویه‌های باکتری لیستریا منوسیتوژنز مورد بررسی قرار گرفت. یک ایزوله‌ی باکتری انتروکوک، که دارای تولید قابل ملاحظه‌ی باکتریوسین بر علیه همگی سویه‌های لیستریا منوسیتوژنز مورد مطالعه بود، به روش فنوتیپی و بیوشیمیایی و نیز روش ملکولی 16SrRNA مورد شناسایی قرار گرفت و در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) ثبت گردید. در مرحله‌ی بعد، این باکتریوسین خالص سازی شد و اثرات آنزیم‌های مختلف پروتئولیتیک و نیز تیمارهای pH، حرارت و اشعه‌ی ماورای بنفش بر روی آن مورد بررسی قرار گرفت؛ وزن ملکولی آن نیز به روش SDS-PAGE مشخص گردید.

**یافته‌ها:** از ۷۰ سویه‌ی مختلف انتروکوک جدا سازی شده، ۵ ایزوله‌ی انتروکوک دارای اثر مهارتی بر علیه سویه‌های لیستریا منوسیتوژنز بود که از این میان، یک ایزوله بر ضد هر چهار سویه‌ی لیستریا منوسیتوژنز مورد مطالعه، دارای اثر مهارتی بود. بر اساس نتایج تعیین توالی 16SrRNA این ایزوله، مشخص شد که این باکتری، یک سویه از انتروکوک فاسیوم بود که به نام DSH20 و با شماره‌ی دسترسی JX567733.1 در سایت NCBI به ثبت رسید. آنزیم‌های پروتئولیتیک استفاده شده باعث از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین گردید که تأییدی بر پروتئینی بودن این ترکیب بود. باکتریوسین تولیدی به اثر درجه‌ی حرارت بالا، تغییرات pH و اشعه‌ی ماورای بنفش مقاوم بود. وزن ملکولی باکتریوسین جدا سازی شده به روش SDS-PAGE در حدود ۳۵ کیلودالتون تخمین زده شد.

**نتیجه‌گیری:** خصوصیات بیوشیمیایی باکتریوسین مورد مطالعه از قبیل پایداری حرارتی، مقاومت به اشعه‌ی ماورای بنفش و pH بسیار قابل توجه بود. توانایی بالقوه‌ی این باکتریوسین، آن را به عنوان ترکیب ضد میکروبی جایگزین علیه لیستریا منوسیتوژنز و نیز نگه‌دارنده‌ی غذاهای تخمیری مطرح می‌سازد.

**واژگان کلیدی:** باکتریوسین، انتروکوک مقاوم به وانکومايسين، لیستریا منوسیتوژنز، بیماری لیستریوز

**ارجاع:** شکری داریوش، زاغیان سعیده، فاضلی حسین، مباشری زاده سینا، عطایی بهروز. جدا سازی و خالص سازی یک باکتریوسین مقاوم به اشعه‌ی ماورای بنفش از سویه‌ی DSH20 انتروکوک فاسیوم دارای اثر ضد باکتری لیستریا منوسیتوژنز. مجله دانشکده پزشکی

اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۳۶): ۶۴۹-۶۶۰

۱- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- دانشیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های گرمسیری و عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: dariush.shokri61@yahoo.com

نویسنده‌ی مسؤؤل: داریوش شکری

## مقدمه

باکتری لیستریا منوسیتوژنز یک باکتری کوکوباسیل تا باسیل، Gram مثبت و غیراسپورزا می باشد که میزان و پراکندگی آن در طبیعت زیاد است. این باکتری در انسان و حیوان بیماری زا است و عوارض مختلفی را ایجاد می کند؛ عامل بیماری لیستریوز است که از بیماری های مشترک انسان و حیوان می باشد و در افراد مستعد، همانند گیرندگان پیوند اعضا، مبتلایان به لنفوم و ایدز، می تواند مننژیت اولیه، انسفالیت یا سپتی سمی ایجاد کند (۱).

راه اصلی انتقال این باکتری به انسان از طریق مصرف غذاهای آلوده است و موارد زیادی از درگیری با این باکتری به صورت اپیدمی یا موارد تک گیر، بر اثر مصرف غذای آلوده، گزارش شده است؛ از آن جایی که این باکتری در همه جا یافت می شود، پتانسیل بالای خطر آلودگی محصولات گوشتی، شیر خام و پاستوریزه و فرآورده های شیر با این باکتری در مطالعات بسیاری از کشورهای مختلف نشان داده شده است (۲-۱). بنابراین، جلوگیری از آلودگی مواد غذایی با این باکتری نقش بسیار مهمی در سلامت جامعه از خطرات آن ایفا می کند.

باکتریوسین ها پپتیدهای ضد میکروبی ساخته شده توسط ریبوزوم ها هستند که توسط باکتری ها تولید شده، به طور معمول علیه سویه های مشابه ارگانسیم تولید کننده خود فعالیت می کنند (۳-۴). باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری ها، به عنوان جایگزین آنتی بیوتیک های مرسوم در تیمار عفونت های انسانی مناسب به نظر می رسند و در سال های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده اند؛ به طوری که، بسیاری از این پپتیدهای ضد میکروبی

فعالیت مؤثری علیه باکتری هایی که به آنتی بیوتیک های مرسوم مقاوم هستند، از خود نشان می دهند. مطالعات مختلفی به بررسی کاربردهای درمانی باکتریوسین ها به عنوان عوامل ضد میکروبی پرداخته اند (۵-۷).

از طرف دیگر، کاربرد رایج باکتریوسین ها به عنوان ماده ای افزودنی و محافظ در صنایع غذایی است؛ باکتریوسین ها سال ها است که به عنوان نگه دارنده ای مواد غذایی کاربرد دارند و می توانند برای بهبود امنیت و کیفیت غذاهای تخمیر شده مورد استفاده باشند (۳). این پروتئین ها می توانند به صورت یک ماده ای افزودنی در غذاها، از رشد باکتری های بیماری زا و اسپورهای آن ها جلوگیری کنند. این روش می تواند به عنوان ابزاری برای محافظت از غذاها در محیط به کار گرفته شود و باعث کاهش مسمومیت های غذایی مربوط به غذاهای تخمیر شده گردد (۷، ۳).

یکی از روش های استریزاسیون مواد غذایی و داروهای تولیدی استفاده از اشعه ی ماورای بنفش (Ultraviolet یا UV) است که اغلب میکروارگانسیم ها به آن حساس می باشند؛ استفاده ی هم زمان از این اشعه و باکتریوسین های مقاوم به آن در مواد غذایی و داروهای تولید شده می تواند به طور کامل از رشد میکروارگانسیم ها جلوگیری کند (۸). گزارش های کمی در مورد باکتریوسین های مقاوم به اشعه ی UV وجود دارد. هدف از این مطالعه، جدا سازی و خالص سازی باکتریوسین های مقاوم به اشعه ی UV از سویه های انتروکوک بود که هم زمان بر ضد باکتری لیستریا منوسیتوژنز نیز فعال باشند.

## روش‌ها

در ابتدا، سویه‌های مختلف باکتری انتروکوک از نمونه‌های گوناگون بالینی جدا سازی و شناسایی شد. شناسایی ایزوله‌ها توسط رنگ‌آمیزی Gram و تست‌های بیوشیمیایی به انجام رسید؛ این تست‌ها شامل کاتالاز، Bile Esculin، مقاومت به نمک ۶/۵ درصد، PYR (هیپیدرولیز L-pyrrolidonyl- $\beta$ -naphthylamide)، مقاومت به دیسک‌های Optochin و باسیتراسین، CAMP (Christie Atkins Munch-Petersen) و همولیز بر روی محیط Blood agar بود.

به منظور جدا سازی باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین، سویه‌های مختلف باکتری انتروکوک جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی به محیط Triptikase soy broth بدون گلوکز و غنی شده با عصاره‌ی مخمر ۰/۵ درصد (TSBYE) منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲ میکرولیتر از هر یک از این محیط‌ها به صورت نقطه‌ای بر روی پلیت حاوی Triptikase soy broth بدون گلوکز و غنی شده با عصاره‌ی مخمر ۰/۵ درصد (TSBYE) کشت داده شد. آن گاه، ۸ میلی‌لیتر از محیط کشت TSAYE (Tryptic soy agar with 0.6% yeast extract) حاوی ۰/۶ درصد Agar، که با  $10^6$  CFU/ml از سه سویه‌ی مختلف لیستریا منوسیتوژنز جدا سازی شده از نمونه‌های بالینی و یک سویه‌ی استاندارد لیستریا منوسیتوژنز (PTCC 1294: Persian Type Culture Collection, Iran)، به عنوان سویه‌ی معرف، تلقیح شده بود، بر روی پلیت‌ها اضافه گردید. پس از انکوباتور گذاری در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، باکتری‌هایی که در اطراف خود

هاله‌ی عدم رشد ایجاد کرده بودند، جدا سازی شدند. برای بررسی تولید باکتریوسین در باکتری‌های جدا شده، کلونی‌هایی که در مرحله‌ی قبل تشکیل هاله‌ی عدم رشد داده بود، به محیط TSBYE منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس، محیط‌های کشت با سرعت  $13000$  rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع رویی این لوله‌ها جدا شد و pH آن روی ۷ تنظیم گردید. این مایع رویی به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد و سپس با فیلتر ۰/۴۵ میکرون، فیلتر گردید. ۲۰ میکرولیتر از مایع رویی خنثی شده به صورت نقطه‌ای به پلیت‌های حاوی محیط کشت Tryptic soy agar (TSA) که پیشتر با  $10^6$  CFU/ml از سویه‌های لیستریا به صورت چمنی تلقیح شده بود، قرار گرفت. این پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس برای ایجاد هاله‌ی عدم رشد مورد بررسی قرار گرفت. از محیط کشت TSBYE با  $pH = 7$ ، که ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت دیده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

به منظور بررسی اثر آنزیم‌های مختلف روی فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین، آنزیم پیسین ( $pH = 3$ )، پروتئیناز K و تریپسین ( $pH = 7$ ) در غلظت نهایی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده گردید. به ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی خنثی شده از باکتری‌های تولید کننده‌ی باکتریوسین به طور جداگانه ۲۰ میکرولیتر از محلول آنزیم‌های پروتئیناز K، تریپسین و پیسین اضافه شد. سپس، این محلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد

فعالیت باکتریوسین، مایع رویی به روش قبلی تهیه و در ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۰، ۲۰ و ۴۵ دقیقه و ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه (حرارت اتوکلاو) حرارت داده شد و میزان اثر مهارى آن به روش رقت‌سازی Broth micro dilution مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی اثر pH روی فعالیت باکتریوسین، pH مایع رویی محیط کشت با استفاده از NaOH ۵ مولار و HCl ۵ مولار بین ۱۰-۵ تنظیم و نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از این مدت، pH نمونه‌ها روی ۷ تنظیم و میزان فعالیت ضد میکروبی آنها به روش رقت‌سازی Broth micro dilution بررسی شد.

برای بررسی اثر اشعه‌ی UV روی فعالیت باکتریوسین، مایع رویی تهیه شده به مدت‌های ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه زیر نور UV با مقدار ۲۰ ژول قرار گرفت و سپس، میزان فعالیت ضد میکروبی آن به روش رقت‌سازی Broth micro dilution مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور جدا سازی و خالص سازی نسبی باکتریوسین، ابتدا نمونه‌ی باکتریوسین رسوب داده شد؛ برای این عمل از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری در TSAYE در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد. بدین منظور، ابتدا با ۱۵ دقیقه سانتریفوژ در ۴۰۰۰ rpm در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سلول‌ها جدا شدند. سپس، به مایع رویی به اندازه‌ی سولفات آمونیوم اضافه گردید تا محلول ۶۰ درصد از سولفات آمونیوم ایجاد شود؛ در مرحله‌ی بعد، نمونه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد با هم‌زنی

قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، با حرارت دادن محلول‌ها در ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آنزیم‌ها غیرفعال گردید. سپس، میزان فعالیت ضد میکروبی این محلول‌ها به روش رقت‌سازی Broth micro dilution در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

برای این کار، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت TSBYE به تمام چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از باکتریوسین به دست آمده (مایع رویی خنثی شده) به اولین چاهک هر ردیف اضافه شد و رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ و ... از آن در چاهک‌های بعدی هر ردیف تهیه گردید. آن گاه، ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری معرف لیستریا منوسیتوژنز در غلظت نهایی ۱۰<sup>۶</sup> کلنی در میلی‌لیتر به چاهک‌های حاوی باکتریوسین اضافه شد. در هر ردیف، یک چاهک به عنوان شاهد منفی (حاوی محیط کشت و باکتری معرف) و یک چاهک به عنوان شاهد (حاوی محیط کشت و باکتریوسین) در نظر گرفته شد.

پس از انکوباتورگذاری در ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۸ ساعت، کدورت چاهک‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay reader) بررسی شد. فعالیت باکتریوسین که به صورت واحدهای فعال در هر میلی‌لیتر بیان می‌گردد، از رابطه‌ی زیر به دست آمد:

$$AU/ml = 2^n \times (1000/100)$$

که در این فرمول، n شماره‌ی آخرین چاهکی است که سویی‌ی معرف در آن هیچ رشدی نداشته است. برای تعیین اثر درجه‌ی حرارت روی میزان

در مرحله‌ی بعد، برای بررسی اثر ضد میکروبی باکتریوسین تولید شده بر روی ژل پلی‌آکریل آمید، قسمتی از ژل که حاوی نمونه و شاهد بود، پس از حذف SDS از ژل، به پلیت استریل منتقل و به خوبی با آب دوبار تقطیر استریل شستشو داده شد (حداقل ۵ ساعت و چند بار شستشو با هم‌زنی انجام گرفت). سپس، به پلیت حاوی TSA که سویه‌ی استاندارد لیستریا منوسیتوژنز در غلظت  $10^6$  CFU/ml به صورت چمنی بر روی آن کشت داده شده بود، منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و اثر مهارى ماده‌ی ضد میکروبی بر روی ژل بررسی شد.

برای شناسایی دقیق سویه‌ی انتروکوک تولید کننده‌ی باکتریوسین فوق از روش 16SrRNA استفاده شد. برای تکثیر DNA با روش PCR (Polymerase chain reaction) از یک جفت پرایمر RW01 و DG74 استفاده گردید که مربوط به ژن 16SrRNA باکتری‌ها است. محصول حاصل از این پرایمرها حدود ۳۷۰ bp است. خصوصیات پرایمرهای تشخیص توالی در جدول ۱ نشان داده شده است. مخلوط PCR مطابق جدول ۲ آماده و با استفاده از آب دوبار تقطیر استریل، حجم آن به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس، واکنش PCR طبق شرایط گفته شده در جدول ۳ انجام گرفت.

آرام نگهداری گردید. این محلول به مدت ۱ ساعت با دور rpm ۲۰۰۰۰ در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد سانتریفوژ شد و رسوب‌ها جمع‌آوری گردید. در مرحله‌ی بعد، خالص سازی نسبی به انجام رسید؛ به این منظور، رسوب‌های حاصل از مرحله‌ی قبل در بافر فسفات با  $pH = 7/4$  حل شد. سپس، حجم مساوی از مخلوط کلروفرم و متانول به نسبت ۲:۱ (V/V) به آن‌ها اضافه شد و ۱ ساعت در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. آن گاه، در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، با سرعت rpm ۲۰۰۰۰ سانتریفوژ شد و رسوب سفید به دست آمده از این محلول‌ها جدا و در آب دو بار تقطیر استریل حل گردید.

برای تخمین وزن مولکولی باکتریوسین جدا شده، از روش SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) استفاده گردید و سپس، Coomassie Brilliant Blue برای رنگ‌آمیزی پروتئین‌ها پس از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل آمید استفاده شد. ژل به مدت ۲ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی قرار داده شد و سپس، با محلول رنگ‌بر، رنگ اضافی از سطح ژل خارج گردید. برای این کار باید ژل به مدت ۲-۴ ساعت در محلول رنگ‌بر قرار گیرد و طی این مدت، محلول چندین بار تعویض گردد تا باندهای مربوط به پروتئین جدا شده، روی ژل ظاهر شود.

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای تشخیص توالی استفاده شده

محصول	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای ذوب پرایمر (درجه‌ی سانتی‌گراد)
Polymerase chain reaction	RW01	5'-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3'	۶۰
	DG74	5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3'	۵۹

گرم مثبت دیپلوکوک و زنجیره‌ای با واکنش کاتالاز منفی، Bile Esculin مثبت و مقاوم به نمک ۶/۵ درصد و مقاوم به دیسک‌های Optochin و باسیتراسین و تست PYR مثبت و همولیز الفیا یا بدون همولیز بر روی محیط Blood agar و تست CAMP منفی به عنوان سویه‌های انتروکوک شناخته شدند. از این سویه‌ها، ایزوله‌هایی که مقاومت به دیسک ونکومایسین داشتند، به عنوان سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE یا Vancomycin resistant enterococcus) در نظر گرفته شدند؛ مقاومت به دیسک ونکومایسین توسط روش MIC (Minimum inhibitory concentration) به کمک روش E-test به اثبات رسید. همچنین، سه سویه‌ی لیستریا منوسیتوژنز که از نمونه‌های مختلف بالینی جدا سازی شده بود و یک سویه‌ی استاندارد آن به عنوان معرف برای بررسی تولید باکتریوسین توسط ۷۰ سویه‌ی انتروکوک مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج تولید باکتریوسین به روش نقطه‌ای (شکل ۱) نشان داد که از بین ۷۰ ایزوله‌ی انتروکوک جدا سازی شده، ۵ ایزوله دارای فعالیت بر ضد گونه‌های لیستریا منوسیتوژنز مورد مطالعه بود؛ از بین این ۵ سویه، یک سویه دارای فعالیت قابل ملاحظه‌ای بر ضد هر سه سویه‌ی لیستریای جدا شده از نمونه‌های بالینی و سویه‌ی استاندارد آن بود.

این سویه برای مطالعات بیشتر مد نظر قرار گرفت و برای شناسایی دقیق آن، از روش 16srRNA استفاده شد؛ نتایج حاصل از تعیین توالی محصول به دست آمده (شکل ۲) مشخص کرد که این باکتری، یک سویه از انتروکوک فاسیوم مقاوم به ونکومایسین

جدول ۲. شرایط آماده سازی مخلوط

(PCR) Polymerase chain reaction

مواد	حجم (μL)
بافر	۲/۵
MgCl <sub>2</sub>	۰/۷
dNTP	۰/۵
پرایمر	۱
نمونه	۲
آنزیم DNA Taq Polymerase	۰/۵

جدول ۳. شرایط انجام واکنش

(PCR) Polymerase chain reaction

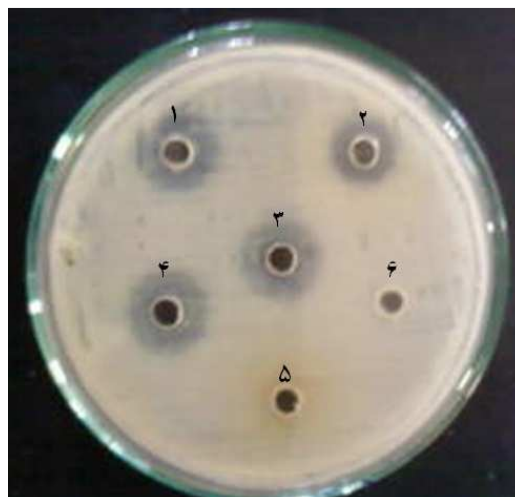
مرحله	زمان (دقیقه)	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	عمل
P <sub>1</sub>	۵	۹۵	
P <sub>2</sub> (۳۰ سیکل)	۱	۹۴	دناتوراسیون
	۱	۵۴	اتصال پرایمرها
P <sub>3</sub>	۱	۷۲	تکثیر
	۱۰	۷۲	

در نهایت، به منظور تعیین توالی محصول PCR، محصول PCR سویه‌ی مورد نظر به همراه پرایمرهای RW01 و DG74، برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست (ایران) ارسال گردید. توالی به دست آمده با استفاده از ابزار جستجوگر BLASTn در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی مقایسه شد و شباهت (همولوژی) بالای ۹۹ درصد ملاک شناسایی باکتری قرار گرفت.

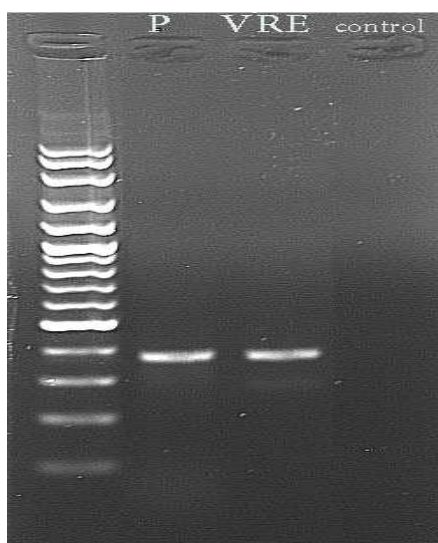
یافته‌ها

از نمونه‌های بالینی مختلف ۷۰ سویه‌ی مختلف انتروکوک جدا سازی گردید. باکتری‌های کوکسی

Broth micro dilution در برابر نمونه‌ی شاهد، که تیماری روی آن انجام نگرفته بود، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر مهاري ایزوله‌های جدا سازی شده توسط این آنزیم‌ها به طور کامل از بین رفت؛ این یافته، تأیید کننده‌ی پروتئینی بودن عامل مهاري مشاهده شده بود (جدول ۴).



شکل ۱. بررسی اثر ضد میکروبی سویه‌های جدا سازی شده‌ی انتروکوک بر روی لیستریا منوسیتوژنز به روش نقطه‌ای تولید باکتریوسین با ایجاد هاله‌ی عدم رشد در سویه‌های شماره‌ی ۱، ۲، ۳ و ۴ مشخص است و در سویه‌ی شماره ۵ تولید منفی می‌باشد. سویه‌ی شماره‌ی ۶، شاهد منفی است.



شکل ۲. محصول Polymerase chain reaction (PCR)

سویه‌ی انتروکوک مقاوم به ونکومايسين (VRE) یا تولید کننده‌ی باکتریوسین که شناسایی ملکولی آن انجام گرفت.

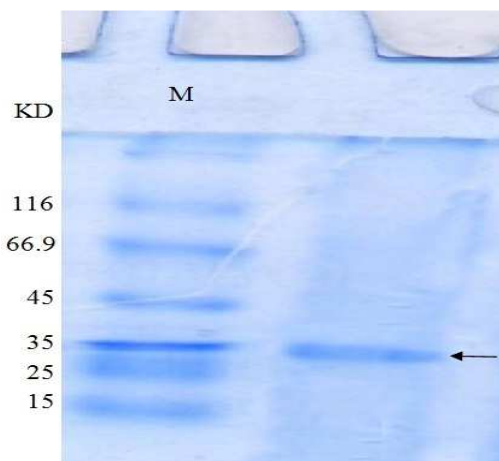
است که به نام DSH20 و با شماره‌ی دسترسی JX567733.1 در سایت NCBI به ثبت رسید.

در مرحله‌ی بعد، ماده‌ی ضد باکتری استخراج گردید و برای تأیید پروتئینی بودن آن، اثر آنزیم‌های پروتئولیتیک تریپسین، پپسین و پروتئیناز K روی میزان فعالیت باکتریوسین با روش رقت‌سازی

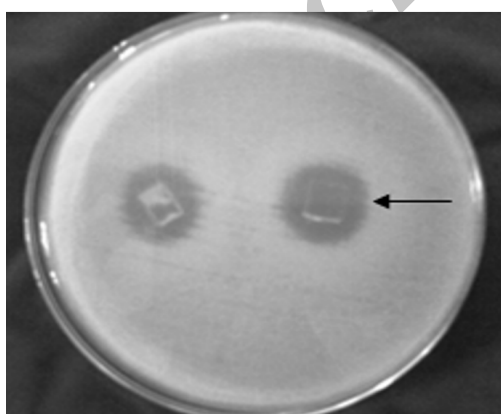
جدول ۴. اثر تیمارهای حرارت و آنزیم‌های پروتئولیتیک بر فعالیت باکتریوسین مورد مطالعه

تیمار	میزان فعالیت (درصد)
شاهد	۱۰۰
آنزیم‌های پروتئولیتیک	۰
پپسین، تریپسین و پروتئیناز K	
دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
۶۰	۳۰
۱۰۰	۱۰
۱۰۰	۲۰
۱۰۰	۴۵
۱۲۱ (دمای اتوکلاو)	۱۵

وزن حدود ۳۵ کیلو دالتون بود (شکل ۳). همچنین، اثر ضد میکروبی باکتریوسین تولید شده بر روی ژل پلی آکریل آمید نیز تأیید شد؛ هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط قطعات برش یافته‌ی ژل بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز، در شکل ۴ مشخص است.



شکل ۳. تخمین وزن مولکولی باکتریوسین جدا شده به کمک روش سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) Sodium dodecyl sulfate (polyacrylamide gel electrophoresis) باند به وزن حدود ۳۵ کیلو دالتون در سمت راست مشخص است که نشان دهنده‌ی وزن مولکولی باکتریوسین جدا سازی شده است



شکل ۴. بررسی اثر ضد میکروبی باکتریوسین تولید شده بر روی ژل پلی آکریل آمید هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط قطعات برش یافته‌ی ژل بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز مشخص است.

اثر درجه‌ی حرارت بالا، به منظور تعیین میزان پایداری روی فعالیت باکتریوسین در مقایسه با نمونه‌ی شاهد بدون تیمار ارزیابی گردید؛ نتایج نشان داد که باکتریوسین جدا سازی شده، از نظر مقاومت حرارتی به طور کامل مقاوم به حرارت است و حتی بعد از ۱۵ دقیقه حرارت دیدن در اتوکلاو نیز تا ۷۵ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌نماید (جدول ۴).

برای تعیین پایداری اثر مهارتی مشاهده شده، اثر pH روی میزان فعالیت ضد میکروبی به روش رقت سازی Broth micro dilution بررسی شد؛ نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی مشاهده شده، در شرایط اسیدی و قلیایی پایدار است؛ به طوری که، در pH برابر ۵، ۹۰ درصد و در pH برابر ۱۰، تا ۷۰ درصد فعالیت آن حفظ می‌شود (جدول ۵).

از طرف دیگر، نتایج نشان داد که باکتریوسین تولید شده توسط سویه‌ی DSH20 انتروکوک فاسیوم، در برابر اشعه‌ی UV به طور کامل مقاوم است و تا ۳۰ دقیقه این اشعه را با قدرت ۲۰ ژول با حفظ کامل فعالیت خود تحمل می‌کند (جدول ۵).

جدول ۵. اثر تیمارهای pH و اشعه‌ی ماورای بنفش (UV) بر فعالیت باکتریوسین مورد مطالعه

تیمار	میزان فعالیت (درصد)
شاهد	۱۰۰
pH	
۵	۹۰
۶-۸	۱۰۰
۱۰	۷۰
اشعه‌ی ماورای بنفش	
۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه	۱۰۰

تخمین وزن مولکولی باکتریوسین جدا شده به کمک روش SDS-PAGE نشان دهنده‌ی یک باند به



## بحث

امروزه باکتریوسین‌ها به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم در تیمار عفونت‌های انسانی مد نظر قرار گرفته و مطالعات مختلفی کاربردهای درمانی آن‌ها را به عنوان عوامل ضد میکروبی مورد بررسی قرار داده است (۹-۵). از طرف دیگر سال‌هاست که باکتریوسین‌ها به عنوان ماده‌ی افزودنی و نگه‌دارنده در صنایع کاربرد دارند. باکتریوسین‌های تولیدی توسط انتروکوک‌ها، که به نام کلی انتروکوک‌ها شناخته می‌شوند، در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و تا کنون، تعداد زیادی از انتروکوک‌ها مطالعه شده است (۱۴-۱۰، ۶).

در این مطالعه، جدا سازی و خالص سازی باکتریوسین‌های مقاوم به اشعه‌ی UV در ایزوله‌های انتروکوک مورد نظر بود که بر ضد باکتری لیستریا منوسیتوژنز نیز فعال باشند؛ نتایج نشان داد که ۵ ایزوله‌ی انتروکوک، دارای اثر مهار بر ضد سویه‌های لیستریا منوسیتوژنز بودند. از این میان، یک سویه‌ی آن‌ها بر ضد هر چهار سویه‌ی لیستریا منوسیتوژنز دارای اثر مهار بود. امروزه توانایی انتروکوک‌ها در مهار گونه‌های مختلف لیستریا به خوبی شناخته شده است. این موضوع ممکن است به دلیل ارتباط فیلوژنتیک نزدیک انتروکوک و لیستریا شرح داده شود (۲).

Aunpad و Na-Bangchang گزارش دادند که پومیلی سین ۴، که توسط باسیلوس پومیلوس WAPB4 تولید می‌شود، علاوه بر مهار لیستریا منوسیتوژنز، استافیلوکوکوس آرتوس و باسیلوس سرئوس، رشد استافیلوکوکوس آرتوس مقاوم به متی‌سیلین و انتروکوکوس مقاوم به وانکومایسین را

نیز مهار می‌کند (۵). زاغیان و همکاران نیز ایزوله‌هایی از باسیلوس را جدا سازی کردند که دارای اثر مهار بر رشد باکتری‌های لیستریا منوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرتوس بود (۲). همچنین، Nascimento و همکاران نیز فعالیت ضد میکروبی سویه‌ی FAIR-E198 از باکتری انتروکوک فاسیوم را بر ضد پاتوژن‌های Gram مثبت نظیر لیستریا منوسیتوژنز نشان دادند (۶).

پایداری مواد ضد میکروبی تولید شده توسط ایزوله‌های جدا شده در این پژوهش، تحت شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، حساسیت باکتریوسین تولید شده نسبت به آنزیم‌های تریپسین، پپسین و پروتئیناز K بررسی شد که این آنزیم‌ها باعث از بین رفتن فعالیت ضد میکروبی آن شدند؛ این یافته، تأییدی بر پروتئینی بودن ترکیب ضد میکروبی تولید شده و نشان دهنده‌ی ماهیت باکتریوسینی این ترکیب است؛ چرا که، باکتریوسین‌ها از جنس پروتئین می‌باشند. آنزیم‌های پروتئولیتیک باعث از بین رفتن باکتریوسین‌های دیگر مانند پومیلی سین ۴، Bac14B و توچیسین که به ترتیب توسط باسیلوس پومیلوس، باسیلوس سابیلیس و باسیلوس تورنجسیس تولید می‌شوند، نیز شده‌اند (۱۵، ۵، ۲).

اثر درجه‌ی حرارت روی فعالیت باکتریوسین نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ایزوله‌ها به اثر درجه‌ی حرارت بالا مقاوم می‌باشند. پایداری حرارتی خصوصیت مهمی برای باکتریوسین‌ها محسوب می‌شود؛ چرا که استفاده از این باکتریوسین‌ها باعث محافظت طیف وسیعی از داروها و غذاها، که نیازمند حرارت بالا در طی فرآیند آماده

نتایج این مطالعه نشان داد که وزن ملکولی باکتریوسین جدا سازی شده حدود ۳۵ کیلودالتون بود؛ در مطالعات انجام گرفته‌ی قبلی بر روی باکتریوسین‌های تولید شده توسط انتروکوک‌ها (۱۴-۱۰، ۶) این وزن ملکولی مشاهده نشده است و به نظر می‌رسد که، این باکتریوسین یک باکتریوسین جدید باشد؛ البته، این ادعا برای تأیید نهایی، به انجام آزمایشات بیشتری نظیر تعیین توالی اسید آمینه و مقایسه‌ی آن با سایر توالی‌های قبلی موجود در بانک اطلاعات NCBI نیاز دارد.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که خصوصیات بیوشیمیایی ترکیب ضد میکروبی جدا سازی شده از سویه‌ی مورد مطالعه، از قبیل پایداری حرارتی، مقاومت به اشعه‌ی UV و pH بسیار قابل توجه بود. توانایی بالقوه‌ی این باکتریوسین ممکن است در آینده، آن را به عنوان ترکیب ضد میکروبی جایگزین در کنترل عفونت‌های ناشی از لیستریا منوسیتوزنز و نیز نگه‌دارنده‌ی غذاهای تخمیری مطرح سازد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات عفونت‌های بیمارستانی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام گردید. بدین وسیله، از مسئولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌نمایم.

سازی هستند، خواهد شد. پانی‌باسیلین تولید شده توسط پانی‌باسیلوس پلی‌میکسا و پومیلی‌سین ۴ نیز فعالیت خود را پس از اتوکلاو کردن حفظ می‌کنند (۱۵، ۵، ۲). باکتریوسین JB05-1-1 نیز دمای ۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد را به ۳۰ دقیقه تحمل می‌نماید (۱۶).

نتیجه‌ی بررسی تغییرات pH بر فعالیت ضد میکروبی باکتریوسین تولید شده نشان داد که به تغییرات pH حساس نیست. باکتریوسین‌های پانی‌باسیلین، Bac14B و پومیلی‌سین ۴ نیز فعالیت خود را بین pHهای ۹-۲ حفظ می‌نمایند (۱۵، ۵، ۲).

یکی دیگر از خصوصیات مهم باکتریوسین جدا شده، مقاومت آن به اشعه‌ی UV بود؛ با توجه به این که، یکی از روش‌های استریلیزاسیون مواد غذایی و داروهای تولیدی، استفاده از اشعه‌ی UV است، که اغلب میکروارگانیسم‌ها به آن حساس می‌باشند، استفاده‌ی هم‌زمان از این اشعه و باکتریوسین‌های مقاوم به آن در مواد غذایی و داروهای تولید شده می‌تواند به طور کامل از رشد میکروارگانیسم‌ها ممانعت به عمل آورد. گزارش‌های کمی در مورد باکتریوسین‌های مقاوم به اشعه‌ی UV وجود دارد. زاغیان و همکاران (۸) از باکتری باسیلوس پومیلیس یک باکتریوسین جدا سازی کردند که بر ضد باکتری لیستریا منوسیتوزنز، به طور کامل فعال و به اشعه‌ی UV نیز مقاوم بود.

### References

1. Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogga T, Gibbs P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol* 2004; 21(2): 213-6.
2. Zaghian S, Emtiazi G, Shokri D. A bacteriocin with broad antimicrobial activity produced by newly isolated nitrogen-fixing bacillus strains. *J Isfahan Med sch* 2013; 3(218): 2260-9. [In Persian].
3. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 2001; 71(1): 1-20.
4. Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr*

- Pharm Biotechnol 2009; 10(1): 2-18.
5. Aunpad R, Na-Bangchang K. Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol* 2007; 55(4): 308-13.
  6. Nascimento M, Moreno I, Kuaye AY. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 against gram-positive pathogens. *Braz J Microbiol* 2010; 41(1): 74-81.
  7. Naghmouchi K, Paterson L, Forster B, McAllister T, Ohene-Adjei S, Drider D, et al. *Paenibacillus polymyxa* JB05-01-1 and its perspectives for food conservation and medical applications. *Arch Microbiol* 2011; 193(3): 169-77.
  8. Zaghian S, Shokri D, Emtiazi G. Co-production of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) and indole-3-acetic acid hormone (IAA) and their optimization by Taguchi design in *Bacillus pumilus*. *Ann Microbiol* 2012; 62(3): 1189-97.
  9. Hammami I, Rhouma A, Jaouadi B, Rebai A, Nesme X. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. strains. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48(2): 253-60.
  10. Birri DJ, Brede DA, Forberg T, Holo H, Nes IF. Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(2): 483-92.
  11. Kang JH, Lee MS. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. *J Appl Microbiol* 2005; 98(5): 1169-76.
  12. Nilsen T, Nes IF, Holo H. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(5): 2975-84.
  13. Yamashita H, Tomita H, Inoue T, Ike Y. Genetic organization and mode of action of a novel bacteriocin, bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(9): 4352-60.
  14. Zendo T, Eunggrattanagorn N, Fujioka S, Tashiro Y, Nomura K, Sera Y, et al. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. *J Appl Microbiol* 2005; 99(5): 1181-90.
  15. Paik HD, Bae SS, Park SH, Pan JG. Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997; 19(4): 294-8.
  16. He Z, Kisla D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(1): 168-78.

## Isolation and Purification of an Ultraviolet-Stable Bacteriocin Produced by *Enterococcus Faecium* Strain DSH20 against *Listeria monocytogenes*

Dariush Shokri MSc<sup>1</sup>, Saeideh Zaghian MSc<sup>2</sup>, Hossein Fazeli PhD<sup>3</sup>,  
Sina Mobasherizadeh MSc<sup>4</sup>, Behrooz Ataei MD<sup>5</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** Furthermore application of bacteriocins as alternates for antibiotics, they are fermented as food preservation currently. The aim of this study was isolation and purification of ultraviolet-resistant bacteriocins from *enterococci* strains active against *Listeria monocytogenes*.

**Methods:** Different strains of *enterococci* bacteria were isolated and identified from various clinical specimens and bacteriocin production were evaluated against strains of *Listeria monocytogenes*. An isolate of *enterococcus* bacteria that produce significant bacteriocin against all studied strains of *Listeria monocytogenes* was identified based on its phenotypical and biochemical properties as well as its 16SrRNA gene sequencing. In the next stage, this bacteriocin was purified and the effects of proteolytic enzymes, pH, temperature and ultraviolet radiation (UV) on its activity were tested and its molecular weight was determined by SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) method.

**Findings:** 17 strains of enterococci were isolated and five isolates exhibited an inhibitory effect against *Listeria monocytogenes* strains and among them, one *enterococcus* had inhibitory effect against all four strains of *Listeria monocytogenes*. This *enterococcus* was identified as *Enterococcus faecium* strain DSH20 (access number: JX567733.1). Using proteolytic enzymes led to the loss of antimicrobial activity; so, protein nature of it was confirmed. Bacteriocin production was resistant to UV, high temperature and pH changes. The molecular weight of the bacteriocin was at approximately 35 kilodaltons.

**Conclusion:** Biochemical properties of this bacteriocin, such as thermal stability, resistance to UV radiation and pH, were significant. These properties present it as an alternative of antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* and preserving of fermented foods.

**Keywords:** Bacteriocin, Vancomycin-resistant *enterococcus*, *Listeria monocytogenes*, Listeriosis

**Citation:** Shokri D, Zaghian S, Fazeli H, Mobasherizadeh S, Ataei B. Isolation and Purification of an Ultraviolet-stable Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* Strain DSH20 against *Listeria monocytogenes*. J Isfahan Med Sch 2013; 31(236): 649-60

1- PhD Student, Nosocomial Infection Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences AND Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Department of Biology, School of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Nosocomial Infection Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Associate Professor, Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

**Corresponding Author:** Dariush Shokri MSc, Email: dariush.shokri61@yahoo.com