ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳
صفحه ۲۴۹-۲۴۵

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

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

نرگس آهنی[۱]، مجید علیپوراسکندانی*[۱]

۱-دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیار، دانشگاه زابل

Narges Ahani [1], Majid Alipour Eskandani *[1]

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

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

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

چکیده

Bacillus cereus **باکتری گرم مثبت، هوازی و بی هوازی اختیاری و اسپورزایی است که به طور وسیعی در طبیعت انتشار دارد. بسیاری از سویه های این باکتری، باعث مسمومیت غذایی با علایم اسهال و استفراغ می‌شوند. PCR یک روش دقیق و سریع و ارزان و اختصاصی برای شناسایی *Bacillus cereus* انتروتوکسیژنیک در مواد غذایی است، تا مطمئن شویم که مواد غذایی سالم و قابل مصرف می‌باشند. در مطالعه حاضر تعداد ۳۵ نمونه ماهی *Schizothorax zarudnyi* از دریاچه چاه نیمه تهیه شد. از هر کدام از نمونه‌های ماهی با استفاده از محیط کشت انتخابی PEMPA، باسیلوس سرئوس جداسازی شد. توانایی تولید انتروتوکسین در ۱۳ ایزوله بدست آمده از نمونه‌های تایید شده از نظر *Bacillus cereus* با آزمون RPLA مورد بررسی قرار گرفت و حضور ژن *hblA* با روش PCR ارزیابی شد که *Bacillus cereus* و باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک به ترتیب در ۳۷/۲ و ۲۵/۸ درصد از نمونه‌های ماهی شیزوتوراکس زارودنی یافت شد. در این مطالعه همه ایزوله‌های انتروتوکسیژنیک دارای ژن *hblA* بودند و در هیچکدام از ایزوله‌های غیر انترو توکسیژنیک ژن *hblA* یافت نشد. یافته‌ها نشان داد که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) اختصاصی ژن *hblA* می‌تواند برای متمایز کردن ایزوله های باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک از ایزوله‌های باسیلوس سرئوس غیر انتروتوکسیژنیک به کار رود و روش جایگزین مناسبی برای RPLA می‌باشد و قادر است در مدت زمان کوتاه‌تری و با هزینه کمتری ایزوله‌های باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک را از ایزوله‌های باسیلوس سرئوس غیر انتروتوکسیژنیک متمایز کند.**

واژه‌های کلیدی

انتروتوکسین
ژن *hblA*
Bacillus cereus
PCR
Schizothorax zarudnyi

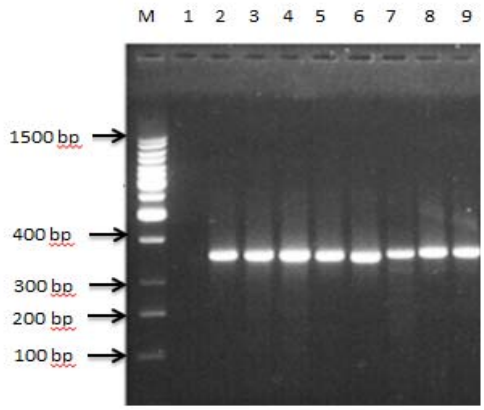
Archive of SID

Bacillus cereus باکتری گرم مثبت، هوازی اختیاری و از خانواده Bacillaceae است. این باکتری متحرک، از نظر واکنش همولیتیک مثبت، کاتالاز مثبت، مقاوم به پنی سیلین و فاقد رشد به شکل ریزوئید است. دمای مناسب رشد این باکتری ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد است ولی تا دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد و در دمای پایین‌تر از ۷ درجه سانتی‌گراد نیز قادر به رشد است (Valero et al. 2007; Tallent et al. 2012)، *Bacillus cereus* قادر به ایجاد دو سندرم مسمومیت غذایی است یکی از سندرم‌های ناشی از این باکتری، شامل تهوع و استفراغ با دوره نهفتگی یک تا ۶ ساعته است و به سندرم استفراغی با دوره کمون کوتاه موسوم است که با علائمی نظیر استفراغ (صددرصد)، کرامپ شکمی (صددرصد) و اسهال (۳۰ درصد) تظاهر می‌نماید. سندرم دیگر ناشی از این باکتری، شامل کرامپ‌های شکمی همراه با اسهال و دوره کمون ۸ تا ۱۶ ساعته است که به سندرم اسهالی با دوره کمون طولانی موسوم می‌باشد، که با علائمی نظیر اسهال (۹۶ درصد)، کرامپ شکمی (۷۵ درصد)، استفراغ (۳۰ درصد) و تب (به ندرت) تظاهر می‌نماید (Phelps and McKillip 2002; Banerjee et al. 2011) سندرم اسهالی به واسطه همولیزین BL ((hemolysin BL (HBL)) (Beecher et al. 1995)، انتروتوکسین غیرهمولیتیک (non-hemolytic enterotoxin (NHE)) (Lund et al. 1996) و سیتوتوکسین K (cytotoxin K) (Lund et al. 2000) ایجاد می‌شود. همولیزین BL تشکیل شده است از binding protein B (۳۵ کیلودالتون) که به وسیله ژن *hblA* کد می‌شود (Heinrichs et al. 1993) lysing protein L1 (۳۶ کیلودالتون) و L2 (۴۵ کیلودالتون) که به ترتیب توسط ژن‌های *hblC* و *hblD* کد می شوند (Ryan et al. 1997). حداکثر بیان فعالیت HBL نیازمند هر ۳ جز پروتئینی می‌باشد. انتروتوکسین غیرهمولیتیک، ۳ جز پروتئینی B، L1 و L2 را دارد که همه آنها برای حداکثر فعالیت سیتوتوکسیک مورد نیاز می‌باشند. این ۳ پروتئین به ترتیب توسط ۳ ژن *nheA*، *nheB* و*nheC* کد می‌شوند (Lund and Granum 1997; Lindback et al. 2004) سیتوتوکسین K (CytK) باسیلوس سرئوس به دلیل دارا بودن فعالیت همولیتیک و سیتوتوکسیک، یک فاکتور مهم در شیوع مسمومیت غذایی است (Lund et al. 2000).

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

Archive of SID
www.SID.ir

برای استخراج DNA از باکتری، باکتری‌های رشد کرده در محیط BHI broth (Brain Heart Infusion) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با g ×۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده، باکتری‌های رسوب‌یافته یکبار در نرمال سالین شسته شد و در ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر اتوکلاو شده، ورتکس شد. سوسپانسیون باکتریایی در حمام آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس بلافاصله در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. بعد رفع انجماد کرده و در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد تا اضافات ته‌نشین شود. مایع رویی حاوی DNA است که ۵ میکرولیتر از آن به عنوان الگو برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد (Banerjee et al. 2011). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Polymerase (Chain Reaction) ژن *hblA* زیرواحد B پروتئین همولیزین BL را کد می‌کند یک انتروتوکسین در باسیلوس سرئوس است. توالی ژن *hblA* در باکتری باسیلوس سرئوس ATCC 14579 را از GenBank بدست آورده و سپس یک جفت آغازگر برای این ژن طراحی شد. این آغازگرها یک قطعه ۳۷۲ جفت بازی از ژن *hblA* را تکثیر می‌کنند (جدول۱). برای انجام واکنش PCR، مخلوط واکنش شامل ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCL، ۵۰ میلی‌مول KCL، ۰/۲ میکرومول از هر آغازگر، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase (شرکت سیناژن Cat. No. ۳۱۶۲۰۲۴۱۸)، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، DNA الگو ۵ میکرولیتر و سپس با آب مقطر استریل حجم نهایی را به ۳۰ میکرولیتر رساندیم (Gitahi et al. 2009). برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر شامل مرحله واسرشت‌سازی (Denaturation) اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال (Annealing) (اتصال آغازگر به رشته‌های الگو) در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله تکثیر (Extention) توسط DNA پلیمراز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه که ۳ مرحله اخیر ۳۰ بار تکرار شد و در نهایت با بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه واکنش‌ها اتمام یافت (Das et al. 2009). محصولات PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد تهیه شده در بافر TAE حاوی اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفتند و به مدت یک ساعت و ۳۰ دقیقه الکتروفورز شدند. سپس تکثیر قطعه مورد نظر زیر نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه حاضر از *Bacillus subtilis* ATCC 6633 به عنوان کنترل منفی استفاده شد. از ۳۵ نمونه ماهی شیزوتوراکس زارودنی تهیه شده از دریاچه چاه نیمه، ۱۳ (۳۷/۲ درصد) نمونه از نظر باسیلوس سرئوس مثبت بودند و ۹ (۲۵/۸ درصد) تا از آنها باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک بودند یعنی ۹ تا از آنها محصول ۳۷۲ جفت بازی که با آغازگرهای اختصاصی برای انتروتوکسین باسیلوس سرئوس تکثیر شده بود را نشان دادند (جدول۳). سویه استاندارد باسیلوس سرئوس ATCC 14579 نیز هم با آزمایش RPLA و هم با PCR ژن *hblA* انتروتوکسیژنیک بود. به عبارت دیگر تمامی ایزوله‌های غیر انتروتوکسیژنیک در PCR ژن *hblA* هیچ باندی ندادند. ۱۳ نمونه آلوده به باسیلوس سرئوس از نظر تولید انتروتوکسین اسهالی با تکنیک RPLA بررسی شدند که ۹ تا از نمونه‌ها آلوده به باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک بودند و در این مطالعه هیدرولیز نشاسته توسط تمام جدایه‌های حاوی ژن *hblA* مشاهده شد. Das et al. (2009) رابطه بین تولید انتروتوکسین اسهالی و حضور ژن‌های بیماری‌زای متفاوت در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از غذاهای دریایی را بررسی کردند. همه جدایه‌های تولیدکننده انتروتوکسین اسهالی حضور ژن‌های انتروتوکسین را نشان دادند درحالی‌که جدایه‌های غیر انتروتوکسیک فاقد این ژن بودند.



شکل۲- الکتروفورز محصول PCR از باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از نمونه‌های ماهی شیزوتوراکس زارودنی با استفاده از آغازگرهای ژن *hblA*. M) ۱۰۰ bp DNA ladder است؛ ۱) باسیلوس سوبتیلیس به عنوان کنترل منفی؛ ۹-۲) ایزوله‌های باسیلوس سرئوس که با آزمایش RPLA انتروتوکسیژنیک بودن آنها نشان داده شد و با آغازگر *hblA* نیز باند ۳۷۲ جفت بازی را نشان دادند.

www.SID.ir
Archive of SID

جدول۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR

ژن *hblA* در باسیلوس سرئوس	توالی اولیگونوکلئوتیدی (′۳ ⟵ ′۵)	تعداد جفت بازها (bp)
آغازگر Forward	GCTAATGTAGTTTCACCTGTAGCAAC	۲۶
آغازگر Reverse	AATCATGCCACTGCGTGGACATATAA	۲۶

جدول۲- نحوه اجرای واکنش PCR

ردیف	مرحله	درجه حرارت (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه‌ها
۱	دناتوره کردن اولیه	۹۵	۳ دقیقه	۱
۲	دناتوره کردن	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۰
	اتصال	۵۸	۴۵ ثانیه	
	تکثیر	۷۲	۱ دقیقه	
۳	تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه	۱

جدول۳- تعداد و درصد نمونه‌ها

نمونه	تعداد نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های باسیلوس سرئوس مثبت(%)	تعداد نمونه‌های باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک مثبت (%)
ماهی *Schizothorax zarudnyi*	۳۵	۱۳ (۳۷/۲ درصد)	۹ (۲۵/۸ درصد)

Ngamwongsatit et al. (2008) در تایلند با روش PCR وسعت گستردگی پنج ژن انتروتوکسین *nhe ABC* ،*cyt K* ،*ent FM* را در *Bacillus cereus* و *Bacillus thuringiensis* بررسی کردند و نتیجه گرفتند پراکندگی این ژن‌ها در هر دو گروه باسیلوس‌ها یکسان است. Agarwal et al. (1997) وجود ارتباط بین هیدرولیز نشاسته و تولید انتروتوکسین در باسیلوس سرئوس‌های جدا شده از گوشت و ماهی و شیر و برنج پخته را گزارش کردند. همچنین Gitahi et al. (2009) در کنیا حضور کمپلکس NHE را در تولیدات شیر و پنیر و برنج پخته مطالعه کردند و از ۵۱ نمونه باسیلوس سرئوس جدا شده ۱۲ نمونه (۳۳/۳ درصد) از شیر و ۸ نمونه (۲۲/۲ درصد) از پنیر و ۳۱ نمونه (۶۰/۷ درصد) از برنج بودند. روش سریع برای تشخیص حضور باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک در غذا از اهمیت زیادی برخوردار است تا از سلامتی غذای مصرفی اطمینان حاصل شود. روش مرسوم در تفکیک سویه‌های باسیلوس سرئوس انتروتوکسیژنیک و غیرانتروتوکسیژنیک آزمون RPLA (Reversed Passive Latex Agglutination) است که استفاده از آن از لحاظ زمانی طولانی است، اما استفاده از PCR بر اساس ژن *hblA* سریع‌تر و ارزان‌تر برای تشخیص انتروتوکسین باسیلوس سرئوس نتیجه می‌دهد.

منابع

Agarwal RK, Kapoor KN, Bachhil VN, Singh BR, Kumar A, Bhilegaonkar KN (1997) Studies on toxigenicity of *Bacillus cereus* strains isolated from food. Indian Journal Comparative Microbiology Immunology Infectious Disease 18: 162-165.

Banerjee M, Nair G, Ramamurthy T (2011) Phenotypic and genetic characterization of *Bacillus cereus* isolated from the acute diarrheal patients. Indian Journal of Medical Research 133: 88-95.

Beecher DJ, MacMillan J (1990) A novel biocomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. Infection and Immunity 58: 2220-2227.

Das S, Surendran PK, Thampuran NK (2009) PCR based detection of enterotoxigenic isolates of *Bacillus cereus* from tropical seafood. Indian Journal Medical Research 129: 316-20.

Gitahi NJ, Ombui JN, Nduati DW, Gicheru MM (2009) Genetis characterisation of food borne *Bacillus cereus*

Archive of SID
www.SID.ir

strains from milk, cheese and rice by multiplex pcr assay. International Journal of Integrative Biology 5: 82-86.
Heinrichs JH, Beecher DJ, Macmillan JM, Zilinskas BA (1993) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology 175: 6760-6766.
Lindback T, Fagerlund A, Rodland MS, Granum PE (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* NHE enterotoxin. Microbiology 150: 3959-3967.
Lund T, Debuyser ML, Granum PE (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. Molecular Microbiology 38: 254-261.
Lund T, Granum PE (1997) Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from different strains of *bacillus cereus*. Microbiology 143:3329-3336.
Lund T, Granum PE (1996) Characterization of a non-hemolytic complex from *Bacillus cereus* isolation after a foodborne outbreak. Federation of European Microbiological Societies 141: 151-156.
Ngamwongsatit P, Buasri W, Pianariyanon P, Pulsrikarn C, Ohba M, Assavanig A, Panbangred W (2008) Broad distribution of enterotoxin genes (*hblCDA*, *nheABC*, *cytK*, *and entFM*) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. International Journal of Food Microbiology 121: 352-6.
Phelps RJ, McKillip JL (2002) Enterotoxin production in natural isolates of *Bacillaceae* outside the *Bacillus cereus* group. Applied Environment Microbiology 68: 3147-3151.
Ryan PA, Macmillan JM, Zilinskas BA (1997) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *bacillus cereus*. Journal of Bacteriology 179: 2551-2556.
Tallent S, Kotewicz K, Bennett R (2012) Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists, Journal of the Association of Official Analytical Chemists 95: 446- 451.
Valero M, Hernández-Herrero LA, Giner MJ (2007) Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. Food Microbiology 24: 671-7.

Archive of SID

www.SID.ir