

Molecular Occurrence of Enterocin A Gene among *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Gastro-Intestinal Tract and Antimicrobial Effect of this Bacteriocin Against Clinical Pathogens

Mitra Salehi¹, Zeinab Hatami¹

1. Department of Microbiology, Islamic Azad University North of Tehran Branch, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:

Received:2014/01/18

Accepted:2014/04/29

Available online:2014/05/05

Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 1393; 8(1): P 18-26

Corresponding author at:

Dr. Zeinab Hatami

Department of Microbiology,
Islamic Azad University North
of Tehran branch, Tehran, Iran.

Email:

hatami_oct@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Enterococci are lactic acid bacteria with ability to produce antimicrobial peptides that called enterocins. Target of present study is research on the presence and antibacterial activity of enterocin A among *Enterococcus faecium* for their potential as alternative antimicrobial compounds, probiotics to control and reduce the pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract and bio-preservatives in food or feed and.

Materials and Methods: In this study occurrence of class II enterocin structural gene (enterocin A) in a target of 42 *Enterococcus faecium* strains, isolated from gastrointestinal tract of animal have been surveyed. *E. faecium* identification and occurrence of enterocin A gene was performed by PCR method. Cell-free neutralized supernatant of gene positive strains was used to test bacteriocin production and antimicrobial spectrum of supernatant was assayed by wall diffusion method on the gram-positive and negative indicators bacteria

Results: Based on our results, 73.8% of isolated strains had enterocin A gene that they inhibited growth of indicator bacteria such as clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteric* PTCC1709, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*.

Conclusions: Studied enterocins have growth inhibitory spectrum on Gram-positive and Gram-negative bacteria especially against pathogenic bacteria in the gastrointestinal tract. Therefore, these strains have the potential to explore and use as, alternative antimicrobial compound and bio-preservatives in food or feed or as probiotics.

Key Words: *Enterococcus faecium*, PCR, Enterocin A, Bacteriocin.

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Salehi M, Hatami Z. Molecular Occurrence of Enterocin A Gene among *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Gastro-Intestinal Tract and Antimicrobial Effect of this Bacteriocin Against Clinical Pathogens. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (1) :18-26

بررسی مولکولی حضور ژن انترووسین A در میان سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم مسیر گوارشی و تاثیر ضد میکروبی این باکتریوسین علیه عوامل بیماری‌زای بیمارستانی

میترا صالحی^۱، زینب حاتمی^۱

۱. گروه میکروبی شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: انتروکوک ها باکتری‌های اسیدلاکتیکی با توانایی تولید پپتیدهای ضد میکروبی (انترووسین ها) می باشند. هدف از این تحقیق، بررسی حضور و خاصیت ضد میکروبی انترووسین A مترشحه از سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم، به دلیل پتانسیل استفاده از آن‌ها بعنوان عوامل ضد میکروبی جدید، پروبیوتیک در جهت کنترل و کاهش عوامل بیماری‌زای مسیر گوارشی انسان و دام و نیز نگهدارنده های زیستی مواد غذایی می باشد.

مواد و روش کار: حضور ژن ساختاری باکتریوسین کلاس II «انترووسین A» در میان سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم جدا شده از محتویات مسیر گوارشی ۴۲ نمونه حیوان مورد بررسی قرار گرفت. تعیین جنس انتروکوکوس و گونه فاسیوم و حضور ژن ساختاری انترووسین A از طریق PCR انجام گرفت. سنجش تولید و طیف ضد میکروبی انترووسین موجود در سوپرناتانت سویه‌های دارای ژن A ent، بر روی باکتری‌های شاهد گرم مثبت و منفی، با روش چاهک گذاری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: ۷۳/۸٪ از سویه‌های مورد بررسی حاوی ژن انترووسین A بودند که تاثیر مهار کنندگی رشد را بر سویه‌های بیمارستانی سودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا انتریکا و سویه‌های آزمایشگاهی باسیلوس سرئوس و باسیلوس سوبتیلیس نشان دادند.

نتیجه‌گیری: انترووسین های مورد بررسی دارای طیف مهار کنندگی رشد بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی به ویژه باکتری‌های بیماری‌زای مسیر گوارشی می باشند؛ بنابراین این سویه ها پتانسیل بالایی جهت بررسی و استفاده بعنوان، ترکیبات ضد میکروبی جایگزین، نگهدارنده های زیستی در صنایع غذایی و خوراک دام و نیز به عنوان پروبیوتیک را دارند.

کلمات کلیدی: انتروکوکوس فاسیوم، PCR، باکتریوسین، انترووسین A

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۰۳/۲۰

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM 1392; 8(1): P 18-26

نویسنده مسئول:

دکتر زینب حاتمی

گروه میکروبی شناسی، دانشگاه
آزاد اسلامی واحد تهران شمال،
تهران، ایران.

پست الکترونیک:

hatami_oct@yahoo.com

مقدمه

مترشحه به خارج) سنتز شونده به صورت ریبوزومی به خوبی شناخته شده است. پپتیدهای ضد باکتری تولید شده توسط انتروکوک ها عمدتاً انترووسین (Enterocin) نامیده می شوند. فراوانی و تنوع بالای ژن های ساختاری انترووسین به همراه احتمال بالای بروز ترکیب ژن ها در بین سویه ها، منجر به افزایش امکان جداسازی سویه های تولید کننده باکتریوسین مؤثر جهت استفاده در علوم پزشکی، صنایع غذایی، پروبیوتیک جهت ارتقاء سلامت حیوانات یا انسان و نیز به کارگیری در دامپزشکی شده است (۴).

انتروکوک ها از باکتری های هم غذایی (commensally) مسیر رودهای انسان و حیوان می باشند. باکتری های جنس انتروکوکوس کوکسی های گرم مثبت، بدون اندوسپور و کپسول مشخص و به ابعاد $(0.6 - 2.0) \times (0.6 - 2.5)$ میکرومتر هستند که در رنگ آمیزی گرم به شکل گرد یا بیضی با آرایش دوتایی یا زنجیر کوتاه مشاهده می شوند. علی رغم اینکه انتروکوک ها به عنوان پاتوژن های فرصت طلب به شمار می آیند، اما از آن ها به عنوان میکروارگانیسم های پروبیوتیک (Probiotic) برای حیوانات و انسان استفاده می شود (۱-۳). توانایی انتروکوک ها جهت تولید باکتریوسین های (پپتیدهای ضد میکروبی

سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* جدا شده از مسیر گوارشی می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت

در این تحقیق سویه‌های باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* طی ۶ ماه از ۴۲ نمونه مدفوع حیوانات (مرغ، سگ، مرغ عشق، اردک، اسب و گوسفند) از مناطق مختلف شهر تهران (دارآباد، تجریش، ونک) و کرج جمع‌آوری شدند.

جداسازی سویه‌های جنس *انتروکوکوس*

یک گرم از هر نمونه مدفوع به نسبت ۱:۱۰ در بافر فسفات سالین (PH: 7.4) رقیق و ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون (Suspension) حاصل در محیط غنی کننده BHI برات به مدت یک شب گرما گذاری شد (۲۰). یک لوپ از هر لوله مرحله فوق (معادل ۱۰ میکرو لیتر) روی محیط افتراقی بایل اسکولین آزید آگار کشت داده شد.

پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری تشکیل کلنی‌های سیاه رنگ نشان‌دهنده هیدرولیز اسکولین می‌باشد. جهت خالص سازی سویه‌های مورد بررسی طی ۳-۴ کشت، کلنی تک از هر پلیت برداشته شد (به دلیل احتمال خارج شدن پلاسمید از سلول باکتریایی طی کشت‌های مکرر، در مرحله خالص‌سازی سوش ها به ۳-۴ کشت اکتفا شد). یک کلنی تک از هر جدایه در محیط BHI برات حاوی ۲۰٪ گلیسرول سوسپانسیون گردید و جهت نگهداری به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شد.

شناسایی با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی

تمام سویه‌ها توسط رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، رشد در محیط ۶/۵٪ نمک، رشد در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، احیای تلوریت، هیدرولیز اسید آمینه آرژنین و تخمیر قندهای آرابینوز، مانیتول، سوربیتول، لاکتوز و سوربوز تعیین هویت شدند (۲۱).

اخیراً انتروسیین‌ها به علت قابلیت استفاده از آن‌ها به عنوان نگهدارنده های زیستی در مواد غذایی انسانی و حیوانی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵، ۶، ۷). به دلیل فعالیت این ترکیبات علیه پاتوژن های منتقل شونده از طریق مواد غذایی و نیز تقاضای مصرف‌کنندگان برای حفاظت طبیعی بیشتر، باکتریوسین‌ها به عنوان نگهدارنده های زیستی در مواد غذایی پیشنهاد می‌شوند و استفاده از آن‌ها در مواد غذایی مورد مطالعه فراوان قرار گرفته است (۸، ۹).

انتروسیین‌ها عمدتاً توسط *انتروکوکوس فاسیوم*، *انتروکوکوس فکالیز* و *انتروکوکوس موندتی ترش* می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: انتروسیین A، CRL35.P، B و 1071A، موندتیسین، موندتیسین KS، باکتریوسین ۳۱، T8.RC714 و انترولیزین A. این انتروسیین‌ها در سیستم رده‌بندی رایج باکتریوسین‌ها (۱۰)، طبقه‌بندی می‌شوند. علی‌رغم مؤثر بودن انتروسیین‌ها علیه باکتری‌های پاتوژن و نیز باکتری‌های آلوده کننده مواد غذایی همچون گونه‌های *لیستریا*، *استافیلوکوکوس*، *باسیلوس*، *کلستریدیوم* و *شریشیاکلی* در سامانه‌های غذایی متعدد (۱۲، ۱۳)، اطلاعات بسیار کمی درباره نقش این باکتریوسین‌ها در اکوسیستم حیوانات در دسترس می‌باشد (۱۴، ۱۵). این‌طور به نظر می‌رسد که تولید باکتریوسین یک مکانیسم دفاعی باکتریایی است که به سویه مولد آن یک مزیت رقابتی را در برابر سویه‌های غیر مولد و یا سویه‌های حساس به باکتریوسین در آن نیچ اکولوژیک اعطا می‌کند (۱۶). مطالعات مختلف توانایی انتروسیین‌ها یا سویه‌های تولیدکننده انتروسیین‌ها را در کنترل یا کاهش باکتری‌های پاتوژن در مسیر گوارشی (مدهای _ روده‌ای) انسان و حیوانات (گونه‌های *کمپیلوباکتر*، *سالمونلا* و *شریشیاکلی*) اثبات کرده‌اند (۱۷، ۱۸). انتروسیین A متشکل از ۴۷ آمینواسید با وزن مولکولی تقریبی ۴۸۲۹ کیلو دالتون می‌باشد. این باکتریوسین از سویه‌های مختلف *انتروکوکوس فاسیوم* از جمله P21 و T136، CTC492 ایزوله شده است (۱۹).

این تحقیق به مطالعه و بررسی حضور ژن ساختاری انتروسیین A و فعالیت ضد میکروبی انتروسیین A در میان

تشخیص مولکولی جنس و گونه باکتری‌های ایزوله شده

در این تحقیق از روش مولکولی واکنش زنجیره پلیمرز برای تشخیص جنس انتروکوکوس و گونه فاسیوم در باکتری‌های ایزوله شده استفاده شد. برای تشخیص جنس انتروکوکوس از واکنش زنجیره پلیمرز مرتبط با 16s rRNA و نیز جهت شناسایی گونه سویه‌هایی که از طریق PCR جنس آن‌ها انتروکوکوس تشخیص داده شده است، از واکنش زنجیره پلیمرز ژن سوپر اکسید دیسموتاز وابسته به منگنز (sodA) استفاده می‌شود (۲۲).

استخراج ژنوم کروموزومی باکتریایی با استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی شرکت متابیون (Metabion) انجام گرفت. توالی پرایمرهای جنس انتروکوکوس (E1 و E2) مطابق پرایمرهای Daizy و همکارانش (۲۲) و توالی پرایمرهای گونه فاسیوم (FM1 و FM2) مطابق با پرایمرهای مطرح شده توسط Jackson و همکارانش (۲۰) طراحی شدند. توالی پرایمرها و برنامه واکنش زنجیره پلیمرز برای جنس انتروکوکوس و گونه فاسیوم در جدول ۱ آورده شده است. واکنش زنجیره پلیمرز در حجم ۲۵ میکرو لیتری که شامل ۱۸/۵ میکرو لیتر آب، ۲ میکرو لیتر بافر PCR، ۰/۳ میکرو لیتر از $MgCl_2$ (50 mM)، ۱ میکرو لیتر از $dNTPs$ (10 mM)، ۱ میکرو لیتر از هر پرایمر، ۱ میکرو لیتر از ژنوم تخلیص یافته و ۰/۲ میکرو لیتر از آنزیم تک پلیمرز بود، انجام گرفت.

برنامه واکنش زنجیره پلیمرز برای جنس انتروکوکوس و گونه فاسیوم مشترک بوده و بدین شرح بود: ۵ دقیقه دناتوراسیون (Denaturation) اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس، سپس محصولات با ۳۰ سیکل از دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۵ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه تکثیر یافتند. چهار میکرو لیتر از محصولات واکنش زنجیره پلیمرز در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و سپس با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید ۱ درصد مشاهده شدند. در این بخش از نشانگر DNA استاندارد ۱۰۰ – ۱۵۰۰ جفت باز شرکت متابیون استفاده شد.

تشخیص مولکولی ژن ساختاری انتروسین A (ent A) در سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم ایزوله شده

به دلیل حضور ژن ساختاری انتروسین A در ژنوم پلاسمیدی سویه‌های انتروکوکوس فاسیوم، در این بخش از تحقیق جداسازی ژنوم پلاسمیدی باکتریایی انجام گرفت. استخراج ژنوم پلاسمیدی باکتریایی با استفاده از کیت استخراج DNA پلاسمیدی شرکت متابیون انجام شد. توالی پرایمرها و برنامه PCR استفاده شده در این بخش مطابق با یافته‌های Aymerich و همکارانش (۲۳) طراحی شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن ساختاری انتروسین A تحت عنوان EntA1 و EntA2 در جدول ۱ ذکر شده اند. واکنش زنجیره پلیمرز ژن ساختاری انتروسین A در حجم ۲۵ میکرو لیتری که شامل ۱۸/۵ میکرو لیتر آب، ۲ میکرو لیتر بافر PCR، ۰/۳ میکرو لیتر $MgCl_2$ (50 mM)، ۱ میکرو لیتر از $dNTPs$ (10 mM)، ۱ میکرو لیتر از هر پرایمر، ۱ میکرو لیتر از ژنوم تخلیص یافته و ۰/۲ میکرو لیتر از آنزیم تک پلیمرز بود، انجام گرفت. برنامه واکنش زنجیره پلیمرز برای ژن ساختاری انتروسین A بدین شرح بود: ۵ دقیقه دناتوراسیون اولیه سپس محصولات با ۳۵ سیکل از دناتوراسیون در ۹۵ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه تکثیر یافتند. ۴ میکرو لیتر از محصولات واکنش زنجیره پلیمرز در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شده و سپس با رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید ۱٪ مشاهده شدند. در این بخش از نشانگر DNA استاندارد ۱۰۰ – ۱۵۰۰ جفت باز متابیون استفاده شد.

تست تولید باکتریوسین

برای آگاهی از تولید انتروسین A توسط انتروکوکوس فاسیوم های دارای ژن ent A، این باکتری ها در محیط MRS براث حاوی ۲٪ گلوکز کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه ی سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس به منظور حذف سلول های باکتریایی، سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ که حاوی انتروسین

اندیکاتور به کمک سوآپ استریل با روش کشت متراکم روی محیط کشت مولر هینتون آگار به طور یکنواخت تلقیح گردید. سپس از محلول های هر یک از میکروتیوب ها به ترتیب رقت به مقدار ۸۰ میکرولیتر در داخل چاهک هایی که توسط پیپت پاستور در محیط ایجاد شده بود، ریخته شد. پلیت ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس گرما خانه گذاری شده و پیدایش یا عدم پیدایش هاله ی رشد بررسی گردید. (شکل ۳).



شکل ۳: در این تصویر فعالیت ضد میکروبی رقت های مختلف (رقت های ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶) انتروسین A علیه سودوموناس آئروجینوزا نشان داده شده است. بالاترین رقتی که دارای فعالیت کشندگی علیه سودوموناس آئروجینوزا می باشد (رقت ۱۲۸ در این عکس)، تحت عنوان تیتراژ بر حسب واحد AU/ml^2 معرفی می شود.

بالاترین رقتی که فعالیت بازدارندگی را در برابر اندیکاتور نشان می دهد به عنوان تیتراژ و با واحد AU/ml^2 (Arbitrary Unit per milliliter²) معرفی شد (جدول ۳).

سویه های کنترل مورد استفاده در این تحقیق

در این تحقیق از سویه *E. faecium* CTC492 به عنوان سوش کنترل مثبت برای تشخیص جنس و گونه /انتروکوکوس فاسیوم و نیز ژن ساختاری انتروسین A در نمونه ها استفاده شد. همچنین سویه های کددار *Staphylococcus aureus* ATCC6538، *Escherichia coli* ATCC8739 و *Salmonella enterica* PTCC1709، به عنوان سویه های شاهد مورد استفاده واقع شدند.

A بودند، پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون در یخچال نگهداری شدند.

طیف ضد میکروبی انتروسین A

برای مشاهده و بررسی فعالیت ضد میکروبی انتروسین A بر روی میکروارگانیزم های بیماریزا از روش چاهک گذاری پلیت (۷) استفاده شد.

روش چاهک گذاری پلیت

در این روش ابتدا بوسیله پیپت پاستور استریل چاهک هایی با فواصل منظم در محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شد. سپس سوسپانسیونی از سویه های مورد آزمایش (لیستریا مونوسیتوژنز، باسیلوس سرئوس، اروینیا آمیلوورا، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوک اورئوس، استرپتوکوک موتانس، انتروکوکوس فکالیس PTCC1206، اشریشیا کلی، *Salmonella enterica* PTCC1709 و سودوموناس آئروجینوزا) با کدورت معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه شده و به کمک سوآپ استریل با روش کشت ۳ مرحله ای روی محیط کشت مولر هینتون آگار به طور یکنواخت تلقیح گردید. از محلول رویی فیلتر شده /انتروکوکوس فاسیوم های دارای ژن انتروسین A، به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در داخل چاهک ها ریخته شد. پلیت ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه ی سلسیوس گرما خانه گذاری شده و پیدایش یا عدم پیدایش هاله ی رشد بررسی گردید. این آزمایش ۳ مرتبه تکرار و میانگین آن گزارش شد.

سنجش تیتراژ (عیار) باکتریوسین

روش عیارگیری باکتریوسین جهت سنجش رقت انتروسین های تولید شده توسط ایزوله های /انتروکوکوس فاسیوم با استفاده از روش کریتیکال (Critical Method) انجام گرفت (۲۴).

در این روش ۱۲ میکروتیوب استریل از رقت های ۱ تا ۱۰-۱۲ محلول سوپرناتانت انتروسین A تهیه شد. در مرحله بعد بوسیله پیپت پاستور استریل چاهک هایی با فواصل منظم در محیط کشت مولر هینتون آگار ایجاد شده و سوسپانسیون معادل غلظت نیم مک فارلند از سوش های

جدول ۲: قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط سوپرناتانت سویه‌های PCR+ ژن انتروسین A بر حسب میلی متر

سویه‌های اندیکاتور	قطر* *
<i>B. cereus</i> *	۹-۱۱
<i>B. subtilis</i> *	۳-۱۹
<i>E. faecalis</i> PTCC1206	۹-۱۲
<i>Erwinia. amylovora</i> *	۸-۱۳
<i>L. monocytogenes</i> *	۱۲-۱۷
<i>P. aeruginosa</i> *	۹-۱۳
<i>S. enterica</i> PTCC1709	۱۰-۱۴
<i>S. aureus</i> ATCC6538	-
<i>E. coli</i> ATCC8739	-

*: سویه‌های بیماری‌زا برای انسان
*: قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر

جدول ۳: تیترا سوپرناتانت سویه‌های دارای ژن انتروسین A

سویه‌های اندیکاتور	تیترا سوپرناتانت انتروسین A
<i>B. cereus</i> *	32 AU/ml ²
<i>B. subtilis</i> *	64 AU/ml ²
<i>E. faecalis</i> PTCC1206	64 AU/ml ²
<i>Erwinia. amylovora</i> *	16 AU/ml ²
<i>L. monocytogenes</i> *	1024 AU/ml ²
<i>P. aeruginosa</i> *	128 AU/ml ²
<i>S. enterica</i> PTCC1709	128 AU/ml ²
<i>S. aureus</i> *	0 AU/ml ²
<i>E. coli</i> *	0 AU/ml ²

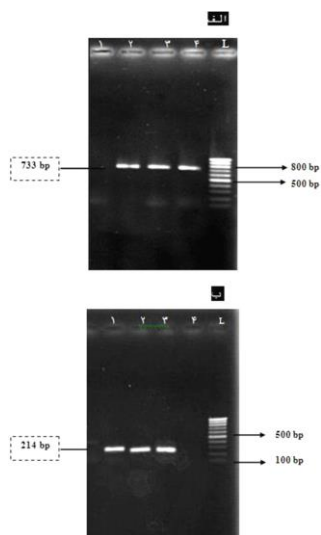
*: سویه‌های بیماری‌زا برای انسان

جدول ۱: توالی پرایمرهای استفاده شده

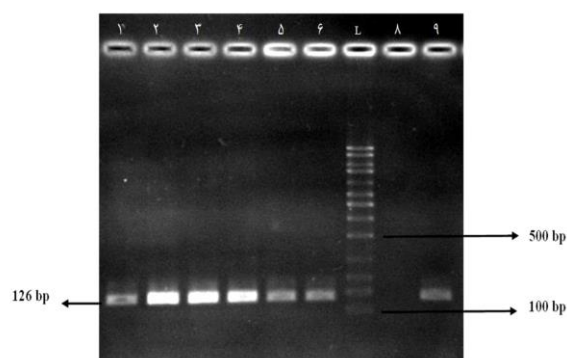
نام پرایمرها	توالی پرایمرها (3'--5')	تاکسون هدف	ژن هدف	هدف	طول قطعه
E1	TCAACCGGGGAGGGT	Enterococcus	16S rRNA	جنس	۷۳۳ bp
E2	ATTACTAGCGATTCCGG				
FM1	ACA ATAGAAGAATTATTATCTG	<i>E. faecium</i>	sodA	گونه	۲۱۴ bp
FM2	CGG CTG CTT TTT TGA ATT CTT CT				
EntA1	GAGATTATCTCCATAATCT	Enterocin A	entA	باکتریوسین	۱۲۶ bp
EntA2	GTACCACTCATAGTGAA				

یافته‌ها

نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی و همچنین PCR، نشان‌دهنده متعلق بودن ۴۲ سویه مورد بررسی (۱۰۰٪) به جنس انتروکوکوس و گونه فاسیوم می‌باشند (شکل ۱).



شکل ۲: الف) ژل الکتروفورز محصول PCR جنس انتروکوکوس، باند با طول 733 bp محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز جنس انتروکوکوس می‌باشد. ستون شماره ۱؛ کنترل منفی، ستون شماره ۲؛ کنترل مثبت (*E. faecium* CTC492)، ستون‌های ۳ و ۴؛ سوش‌های نمونه و 1000bp ladder؛ ب) ژل الکتروفورز محصول PCR گونه فاسیوم، باند با طول 214 bp محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز گونه فاسیوم می‌باشد؛ ستون شماره ۱؛ کنترل مثبت (*E. faecium* CTC492)، ستون‌های ۲ و ۳؛ سوش‌های نمونه، ستون شماره ۴؛ کنترل منفی و 1000bp ladder؛ L.



شکل ۱: الف) ژل الکتروفورز محصول PCR ژن ساختاری انتروسین A، باند با طول 126 bp محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز ژن ساختاری انتروسین A می‌باشد. ستون شماره ۱ تا شماره ۶؛ نمونه‌های دارای ژن ent A، 1000bp ladder؛ L، ستون شماره ۸؛ کنترل منفی، ستون شماره ۹؛ کنترل مثبت (*E. faecium* CTC492).

علاوه بر این در اکثر تحقیقات انجام شده در سراسر جهان، گروه بندی و شناسایی سویه ها با استفاده از تست های بیوشیمیایی و فنوتیپیک، تنها برای سویه های مشخص که معمولاً از نمونه های انسانی جدا می شوند انجام می شود؛ بنابراین ممکن است شناسایی دقیق سویه های جداسده از منابع غیر انسانی (از جمله سویه های حیوانی)، به دلیل حضور همز مان چند گونه در یک نمونه، به روش بیوشیمیایی میسر نباشد.

روش های دیگری که برای تشخیص انتروکوک ها استفاده می شود تکنیک های مولکولی همچون PCR و توالی یابی می باشند (۲۹، ۳۰). برای تشخیص جنس انتروکوکوس همانند سایر جنس های باکتریایی از واکنش زنجیره پلیمرز مرتبط با 16s rRNA استفاده می شود (۲۲). یکی از راه های تشخیص گونه در سویه هایی که از طریق PCR جنس آن ها انتروکوکوس تشخیص داده شده است، انجام PCR برای ژنی خاص می باشد که در هر گونه محصولی با وزن مولکولی متفاوت ایجاد کند. این روش نسبت به روش های مرسوم بیوشیمیایی، روشی دقیق و معتبرتر با صرف هزینه ای کمتر خواهد بود. گزارشات قبلی مشخص کرده اند که ژن *sodA* بعنوان یک ژن ایده آل برای تشخیص گونه انتروکوک ها می باشد (۳۱).

در تحقیق حاضر ۱۰۰٪ نمونه های مدفوع مورد آزمایش باند اختصاصی جنس انتروکوکوس و گونه فاسیوم را نشان دادند.

بر اساس یافته های این تحقیق، ژن ساختاری انتروسین A در ۷۳/۸٪ از ایزوله های انتروکوک به دست آمده از محتویات مسیر گوارشی حضور دارد. هر چند تعیین حضور ژن ساختاری انتروسین الزاماً با تولید باکتریوسین همراه نیست، اما اینطور به نظر می رسد که محیط ها و اکوسیستم های مختلف به سطوح مختلفی از مکانیسم های دفاعی باکتریایی نیاز دارند و بنابراین حضور ژن باکتریوسین اساس تولید باکتریوسین تلقی می شود (۴). به عبارت ساده چنانچه یک سویه واجد ژن باکتریوسین، در یک اکوسیستم با شرایط سخت و حضور میکروارگانیسم های رقیب قرار بگیرد به ترشح باکتریوسین می پردازد، اما اگر همین سویه در محیط های غنی فاقد میکروارگانیسم های رقیب قرار گیرد برایش مقرون به صرفه خواهد بود که ژن تولید کننده باکتریوسین را در حالت خاموش قرار دهد. این فرضیه با این یافته ها که سلول باکتریایی با رشد در محیط های غنی و یا

شناسایی مولکولی ژن ساختاری انتروسین A در میان سویه های انتروکوکوس فاسیوم بر اساس نتایج حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز برای ژن ساختاری *ent A*، ۳۱ سویه از ۴۲ عدد سویه انتروکوکوس فاسیوم مورد بررسی (۷۳/۸٪) ژن ساختاری انتروسین A را دارا بودند (شکل ۲).

فعالیت ضد میکروبی سویه های انتروکوکوس فاسیوم دارای ژن *ent A*

نتایج حاصل از تست چاهک پلیت نشان دادند که انتروسین A دارای فعالیت ضد میکروبی علیه سویه های شاهد *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. faecalis* PTCC1206, *Erwinia. amylovora*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *S. enterica* PTCC1709 بوده ولی فعالیتی را علیه *S. aureus* ATCC6538 و *E. coli* ATCC8739 نشان ندادند. در این میان بیشترین فعالیت ضد میکروبی مشاهده شده بر روی *L. monocytogenes* گزارش شده است.

نتایج میانگین تستهای چاهک پلیت بر روی سویه های اندیکاتور در جدول ۲ و نیز تیتراژ انتروسین A بر روی هر سویه شاهد در جدول ۳ ذکر شده است.

بحث

در دهه های اخیر توجه محققان نسبت به توانایی انتروکوک ها در تولید باکتریوسین ها، طیف فعالیت مهارکنندگی رشد، ویژگی های فیزیکی و بیوشیمیایی باکتریوسین ها و کاربرد آن ها در پزشکی و مواد غذایی معطوف شده است (۴).

تشخیص دقیق گونه های انتروکوکوس تولید کننده پپتیدهای ضد میکروبی جهت ارائه سویه های مناسب به عنوان عوامل پروبیوتیک و نگهدارنده های زیستی مواد غذایی ضروری می باشد. در حال حاضر یکی از روش های استاندارد جهت شناسایی انتروکوک ها، تشخیص بر پایه خصوصیات فنوتیپیک با استفاده از تست های بیوشیمیایی می باشد (۲۵-۲۷). در این روش سویه ها بر اساس رشد در محیط های مختلف، واکنش های بیوشیمیایی، حرکت، تخمیر قند ها و تولید پیگمان طبقه بندی می شوند (۲۰). اگر چه بیش از ۲۰ گونه انتروکوک با استفاده از این روش ها قابل شناسایی هستند، اما این قبیل تست ها عموماً در لوله آزمایش انجام شده و به مدت زمان طولانی جهت گرما گذاری و متعاقباً تفسیر نتایج نیاز دارند (۲۷، ۲۸).

محیط های فاقد میکروارگانیسم های رقیب مقادیر کمتری از ترکیبات ضد میکروبی را تولید می کنند سازگار است (۳۲).

توزیع گسترده ژن ساختاری انتروسین A، احتمالاً به دلیل توانایی قابل توجه انتروکوک ها در انتشار و همچنین دریافت مواد ژنتیکی بین سویه ها و حتی ما بین جنس ها (از جمله بین استافیلوکوک ها و انتروکوک ها) می باشد (۳۳). مکانیسم های انتقال ژنی که در انتروکوک ها به خوبی شناسایی شده اند شامل پلاسمیدهای کانجوگتیو، پلاسمیدهای غیر کانجوگتیو و همچنین ترنسپوزون های کانجوگتیو می باشد (۳۴). بر اساس تحقیقات Stompfova (۴)، فراوانی ژنهای انتروسین بر اساس خاستگاه آن ها متفاوت می باشد که برای رسیدن به نتایج معتبر نیاز به بررسی مجموعه های بزرگتر از سویه ها از مناطق جغرافیایی مختلف و مقایسه مطالعات مستقل از یکدیگر دارد.

بر اساس نتایج این تحقیق، ژن ساختاری انتروسین A، حضور ۷۳/۸٪ را در نمونه های حیوانی نشان داد. در حالیکه در تحقیق Stompfova و همکارانش (۴)، ژن ساختاری انتروسین A حضور ۶۶/۲ درصدی را در نمونه های حیوانی و محیطی مورد آزمایش نشان داده است. تفاوت درصد حضور ژن انتروسین A در این دو تحقیق، احتمالاً به دلیل متفاوت بودن حیوانات و منابع مورد بررسی و نیز تفاوت اقلیم های جغرافیایی می باشد.

جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی انتروسین ها در این تحقیق از مایع رویی کشت سویه های حاوی ژن انتروسین استفاده شد. این مایع فاقد سلول های باکتری بوده و در بردارنده مواد مترشحه به محیط از جمله باکتریوسین، اسید های تولید شده طی تخمیر قند ها، پراکسید هیدروژن و ... می باشد. برای مشاهده فعالیت ضد میکروبی انتروسین ها با خنثی کردن محیط، تاثیر ضد میکروبی احتمالی ناشی از حضور اسید در محیط حذف شد. از سوی دیگر، غلظت پراکسید هیدروژن تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک بسیار ناچیز بوده و بر طیف ضد میکروبی باکتریوسین ها تاثیر نمی گذارد (۳۵).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر، در تکرارهای مختلف آزمون سنجش فعالیت باکتریوسین، طیف ضد میکروبی مایع رویی هر سویه دچار تغییراتی شد که احتمالاً به شرایط کشت باکتری، سرعت نفوذ باکتریوسین به محیط جامد، سرعت رشد باکتری شاخص و میزان پایداری پلاسمید در هر سویه بستگی دارد. از

سوی دیگر تا کنون مهار باکتری های گرم منفی بوسیله باکتری های اسید لاکتیکی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است ولی گزارش های معدودی مبنی بر اثر باکتریوسین های تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیکی علیه باکتری های گرم منفی وجود دارد که احتمالاً به دلیل وجود غشای خارجی بر روی غشای سیتوپلاسمی در باکتری های گرم منفی می باشد (۳۶)؛ اما با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، انتروسین های مورد بررسی دارای طیف مهارکنندگی رشد بر روی باکتری های گرم مثبت همچون *لیستریا مونوسییتوزنز*، *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس سوبتیلیس* و باکتری های گرم منفی همچون *سودوموناس آئروجینوزا*، *سالمونلا انتریکا* *سرووار تایفی* *موریوم* و *اروینیا آمیلوورا* می باشند. انتروسین های مورد بررسی همانند گزارشات پیشین، بیشترین تاثیر ضد میکروبی را بر روی باکتری آلوده کننده مواد غذایی «*لیستریا مونوسییتوزنز*» نشان دادند. از سوی دیگر این باکتریوسین ها فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی را نیز علیه باکتری های گرم منفی *سالمونلا انتریکا* و *سودوموناس آئروجینوزا* نشان دادند. از آنجائیکه سرووارهای مختلف *سالمونلا* نقش عمده ای در بیماری انسان و حیوانات و نیز تلفات دام و طیور دارد و نیز به دلیل خاستگاه گوارشی سویه های مورد مطالعه و توان زنده ماندن در شرایط سخت مسیر گوارشی، این باکتریوسین ها و سویه های مولد آن ها پتانسیل بالایی را جهت بررسی بیشتر و استفاده به عنوان پروبیوتیک نشان می دهند. چرا که انتروسین های ترشح شده توسط این سویه ها همانند سایر گزارشات و در برخی موارد بیش از آن ها، دارای فعالیت ضد میکروبی علیه عوامل پاتوژن سیستم گوارشی و نیز آلوده کننده مواد غذایی می باشند.

در پایان شایان ذکر است که توزیع گسترده ژن های ساختاری انتروسین به همراه امکان حضور ترکیبی آن ها در یک سویه، موثر بودن انتروسین ها جهت کاهش رشد و از بین بردن عوامل پاتوژن سیستم گوارشی - روده ای و همچنین توانایی رشد و زنده ماندن سویه های مولد انتروسین در شرایط محیطی موجود در روده، احتمال جداسازی سویه های مولد باکتریوسین مناسب جهت استفاده به عنوان عوامل ضد میکروبی جایگزین، نگهدارنده های زیستی در صنایع غذایی یا به عنوان پروبیوتیک را افزایش داده است و این امر نیازمند تحقیق و بررسی بیشتر در این زمینه می باشد.

تقدیر و تشکر

از همه عزیزانی که در راستای انجام این پروژه کمک هایشان را دریغ ننمودند نهایت تشکر و قدردانی به عمل می آید.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

References

- 1- Franz CMAP, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH.. *Enterococci* in foods – a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.* 2003;88:105–122.
- 2- Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol.* 1999;47:1–24.
- 3- Cousins DV, Skuce RA, Kaswala RR, van Embden JDA. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1998;2:471–478.
- 4- Strompfova V, Laukova A, Simonova M, Marcinakova M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. *Vet Microbiol.* 2008;132:293–301.
- 5- Noble CJ. Carriage of group D streptococci in the human bowel. *J Clin Pathol.* 1978;4:1182–1186.
- 6- Devriese LA, Pot B. The genus *Enterococcus*. The Lactic Acid Bacteria, The Genera of *Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2 (Wood B.J.B. & Holzapfel W.H. eds). 1995; 327–367.
- 7- De vuyst L, Vandamme EJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria. 1st ed. London: Blackie Academic and Professional. 1994;91–143.
- 8- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001;71:1–20.
- 9- Ohlsson T. Minimal processing-preservation methods of the future: an overview. *Trends Food Sci Technol.* 1994;5:341–352.
- 10- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in *lactic acid bacteria*. *ANTON LEEUW INT J G.* 1996;70: 113–128.
- 11- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by *lactic acid bacteria*. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12:39–86.
- 12- Aymerich T, Garriga M, Ylla J, Vallier J, Monfort JM, Hugas M. Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Prot.* 2000;63:721–726.
- 13- Laukova A, Czikova S. Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on “bryndza”, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. *Microbiol. Res.* 2001;156:31–34.
- 14- Franz CMAP, Belkum MJv, Holzapfel WH, Abriouel H, Galvez A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:293–310.
- 15- Meaney WJ, Twomey DP, Flynn J, Hill C, Ross RP. The use of a bismuthbased teat seal and the bacteriocin Lacticin 3147 to prevent dry period mastitis in dairy cows. In: *Proceedings of the British Mastitis Conference, Garstang.* 2001;24–32.
- 16- Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2003;2:82–100.
- 17- Laukova A, Guba P, Nemcova R, Vasilkova Z. Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the Enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Vet Res Commun.* 2003; 27:275–280.
- 18- Cole K, Farnell MB, Donoghue AM, Stern NJ, Svetoch EA, Eruslanov BN, et al. Bacteriocins reduce *Campylobacter* colonization and alter gut morphology in turkey poults. *Poult. Sci.* 2006;85:1570–1575.
- 19- Herranz C, Mukhopadhyay S, Casaus P, Mart'inez JM, Rodriguez JM, Nes IF, Hernandez PE, Cintas LM. *Enterococcus faecium* P 21: a strain occurring naturally in dry-fermented sausages producing the class II bacteriocins enterocin A and enterocin B. *Food Microbiol.* 2001;18:115–131.
- 20- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett BJ. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of *Enterococci*. *J Clin MICROBIOL.* 2004;48:2:3558–3565.
- 21- Manero A, Blanch AR. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl Env Microbiol.* 1999;65:4425–4430.
- 22- Deasy BM, Rea MC, Fitzgerald GF, Cogan TM, Beresford TP. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* 2000;23:510–522.
- 23- Aymerich T, Holo H, Havarstein LS, Hugas M, Garriga M, Nes IF. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new anti listerial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Appl Environ Microbiol.* 1996;62:1676–1682.
- 24- Mayr-Hartings A, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studying bacteriocins. *Methods Microbiol.* 1972;7: 315–422.
- 25- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink VGH, Holo H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *ANTON LEEUW INT J G.* 1996;70:113–128.
- 26- Hickey RM, Twomey DP, Ross RP, Hill C. Production of enterolysin A by raw milk enterococcal isolates exhibiting multiple virulence factors. *Microbiol.* 2003;149:655–664.
- 27- Facklam RR, and Collins MD. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections

- by a conventional test scheme. J. Clin. Microbiol. 1989;27:731–734.
- 28- Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeiram LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci, Curr Microbiol. 2002;1–54.
- 29- Baele M, Baele P, Vaneechoutte M, Storms V, Butaye P, Devriese LA, et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. J. Clin. Microbiol, 2000;38:4201–4207.
- 30- Goh SH, Facklam RR, Chang M, Hill JE, Tyrrell GJ, Burns EC, et al. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to chaperonin 60 gene sequences. J Clin Microbiol. 2000;38:3953–3959.
- 31- Poyart C, Quesnes G, Trieu-Cuot P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. J Clin Microbiol. 2000;38:415–418.
- 32- Ozdemir GB, Oryasin E, Biyic HH, Ozteber M, Bozdogan B. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. Indian J Microbiol. 2011;51(2): 182–187.
- 33- Murray BE, Mederski-Samoraj BD, Foster SK, Brunton L, Harford P. In vitro studies of plasmid-mediated penicillinase from *Streptococcus faecalis* suggests a staphylococcal origin. J Clin Invest. 1986;77: 289–293.
- 34- Clewell DB. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1990;9:90–102.
- 35- Piard JC, Desmazeaud M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.2: bacteriocins and other antibacterial substances. Lait, 1991;72:113-42.
- 36- Patil MM, Rajini Kumari Y, Ramana KV. Bacteriocin production by *Enterococcus* sp isolated from rat intestine. Int J Environ Sci. 2011;1:1395-1402.