مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۳۶/هفته دوم تیر ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۵

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[۱]، سعیده زاغیان[۲]، دکتر حسین فاضلی[۳]، سینا مباشری‌زاده[۴]، دکتر بهروز عطایی[۵]

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 مهاری بر علیه سویه‌های لیستریا منوسیتوژنز بود که از این میان، یک ایزوله بر ضد هر چهار سویه‌ی لیستریا منوسیتوژنز مورد مطالعه، دارای اثر مهاری 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 ضدمیکروبی 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 وانکومایسین، 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): ۶۶۰-۶۴۹

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 میکروب‌شناسی، 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
نویسنده‌ی مسؤول: داریوش شکری
Email: dariush.shokri61@yahoo.com

مقدمه

باکتری لیستریا مونوسیتوژنز یک باکتری کوکوباسیل تا باسیل، Gram مثبت و غیراسپورزا می‌باشد که میزان و پراکندگی آن در طبیعت زیاد است. این باکتری در انسان و حیوان بیماری‌زا است و عوارض مختلفی را ایجاد می‌کند؛ عامل بیماری لیستریوز است که از بیماری‌های مشترک انسان و حیوان می‌باشد و در افراد مستعد، همانند گیرندگان پیوند اعضا، مبتلایان به لنفوم و ایدز، می‌تواند منتژیت اولیه، انسفالیت یا سپتی‌سمی 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 تک‌گیر، بر اثر مصرف غذای آلوده، گزارش شده است؛ از آن جایی که این باکتری در همه جا یافت می‌شود، پتانسیل بالای خطر آلودگی محصولات گوشتی، شیر خام و پاستوریزه و فرآورده‌های 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 می‌کند.

باکتریوسین‌ها پپتیدهای ضد میکروبی ساخته شده توسط ریبوزوم‌ها هستند که توسط باکتری‌ها تولید شده، به طور معمول علیه سویه‌های مشابه ارگانیسم تولید کننده‌ی خود فعالیت می‌کنند (۴-۳). باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌ها، به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم در تیمار عفونت‌های انسانی مناسب به نظر می‌رسند و در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند؛ به طوری که، بسیاری از این پپتیدهای ضدمیکروبی فعالیت مؤثری علیه باکتری‌هایی که به آنتی بیوتیک‌های مرسوم مقاوم هستند، از خود نشان می‌دهند. مطالعات مختلفی به بررسی کاربردهای درمانی باکتریوسین‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی پرداخته‌اند (۷-۵).

از طرف دیگر، کاربرد رایج باکتریوسین‌ها به عنوان ماده‌ی افزودنی و محافظ در صنایع غذایی است؛ باکتریوسین‌ها سال‌هاست که به عنوان نگه‌دارنده‌ی مواد غذایی کاربرد دارند و می‌توانند برای بهبود امنیت و کیفیت غذاهای تخمیر شده مورد استفاده باشند (۳). این پروتئین‌ها می‌توانند به صورت یک ماده‌ی افزودنی در غذاها، از رشد باکتری‌های بیماری‌زا و اسپورهای آن‌ها جلوگیری کنند. این روش می‌تواند به عنوان ابزاری برای محافظت از غذاها در محیط به کار گرفته شود و باعث کاهش مسمومیت‌های غذایی مربوط به غذاهای تخمیر شده گردد (۷، ۳).

یکی از روش‌های استریزاسیون مواد غذایی و داروهای تولیدی استفاده از اشعه‌ی ماورای بنفش (Ultraviolet یا 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 جلوگیری کند (۸). گزارش‌های کمی در مورد باکتریوسین‌های مقاوم به اشعه‌ی UV وجود دارد. هدف از این مطالعه، جدا سازی و خالص سازی باکتریوسین‌های مقاوم به اشعه‌ی UV از سویه‌های انتروکوک بود که هم‌زمان 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 (هیدرولیز L-pyrrolidonyl-β-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 کننده‌ی 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 ۱۳۰۰۰ 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 = ۷، که ۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت دیده بود، به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

به منظور بررسی اثر آنزیم‌های مختلف روی فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین، آنزیم پپسین (pH = ۳)، پروتئیناز K و تریپسین (pH = ۷) 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 پپسین اضافه شد. سپس، این محلول‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد

قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، با حرارت دادن محلول‌ها در ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، آنزیم‌ها غیرفعال گردید. سپس، میزان فعالیت ضدمیکروبی این محلول‌ها به روش رقت سازی 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 10^6 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 سویه‌ی معرف در آن هیچ رشدی نداشته است.

برای تعیین اثر درجه‌ی حرارت روی میزان 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 مهاری 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 ضدمیکروبی آن‌ها به روش رقت سازی 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 ضدمیکروبی 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 rpm ۴۰۰۰ در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سلول‌ها جدا شدند. سپس، به مایع رویی به اندازه‌ای 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

آرام نگهداری گردید. این محلول به مدت ۱ ساعت با دور ۲۰۰۰۰ rpm 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 = ۷/۴ 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 ۲۰۰۰۰rpm 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 پلی‌آکریل‌آمید 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 ۴-۲ 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.

در مرحله‌ی بعد، برای بررسی اثر ضدمیکروبی 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 مهاری ماده‌ی ضدمیکروبی 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.

جدول ۱. خصوصیات پرایمرهای تشخیص توالی استفاده شده

دمای ذوب پرایمر (درجه‌ی سانتی‌گراد)	توالی پرایمر	نام پرایمر	محصول Polymerase chain reaction
۶۰	5´-AACTGGAGGAAGGTGGGGAT-3´	RW01	۳۷۰ bp
۵۹	5´-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3´	DG74	

جدول ۲. شرایط آماده سازی مخلوط
(PCR) Polymerase chain reaction

مواد	حجم (µL)
بافر	۲/۵
$MgCl_2$	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_1	۵	۹۵	
	۱	۹۴	دناتوراسیون
P_2 (۳۰ سیکل)	۱	۵۴	اتصال پرایمرها
P_3	۱	۷۲	تکثیر
	۱۰	۷۲	

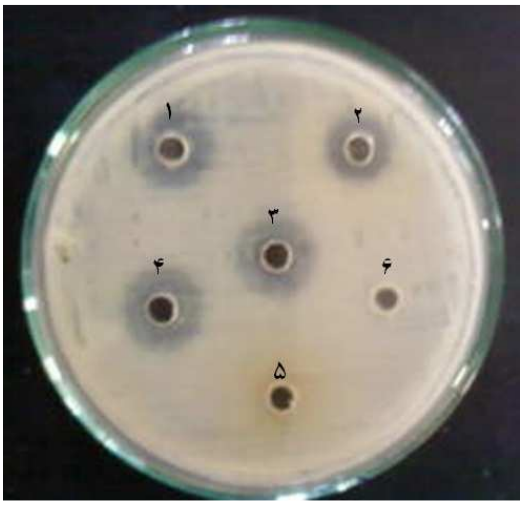
در نهایت، به منظور تعیین توالی محصول PCR، محصول PCR سویه‌ی مورد نظر به همراه پرایمرهای RW01 و DG74، برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست (ایران) ارسال گردید. توالی به دست آمده با استفاده از ابزار جستجوگر BLASTn در سایت NCBI (National Center for Biotechnology Information) با سایر توالی‌های موجود در بانک 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 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 الفا 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.

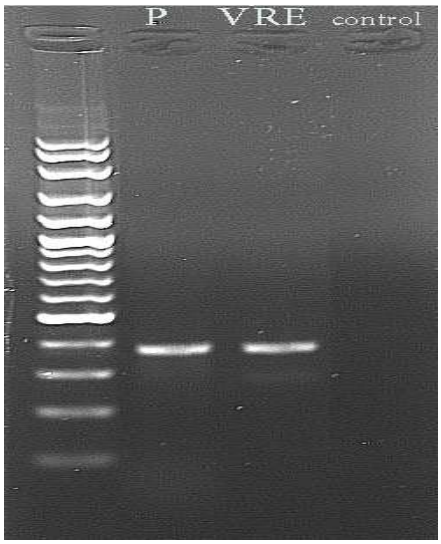
این سویه برای مطالعات بیشتر مد نظر قرار گرفت و برای شناسایی دقیق آن، از روش 16srRNA استفاده شد؛ نتایج حاصل از تعیین توالی محصول به دست آمده (شکل ۲) مشخص کرد که این باکتری، یک سویه از انتروکوک فاسیوم مقاوم به ونکومایسین



شکل ۱. بررسی اثر ضدمیکروبی 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.

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



شکل ۲. محصول Polymerase chain reaction (PCR) سویه‌ی انتروکوک مقاوم به ونکومایسین (VRE یا Vancomycin resistant enterococcus) تولید کننده‌ی باکتریوسین که شناسایی ملکولی آن انجام گرفت.

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

تیمار		میزان فعالیت (درصد)
شاهد		۱۰۰
آنزیم‌های پروتئولیتیک		
پپسین، تریپسین و پروتئیناز K		۰
دما (درجه‌ی سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	
۶۰	۳۰	۱۰۰
۱۰۰	۱۰	۱۰۰
۱۰۰	۲۰	۱۰۰
۱۰۰	۴۵	۹۰
۱۲۱ (دمای اتوکلاو)	۱۵	۷۵

اثر درجه‌ی حرارت بالا، بـه منظـور تعیـین میـزان پایـداری روی فعالیـت باکتریوسـین در مقایسـه بـا نمونه‌ی شاهد بدون تیمار ارزیابی گردید؛ نتایج نشـان داد که باکتریوسین جدا سازی شده، از نظـر مقاومـت حرارتی به طور کامل مقاوم به حرارت اسـت و حتـی بعد از ۱۵ دقیقه حرارت دیدن در اتوکلاو نیـز تـا ۷۵ درصد از فعالیت خود را حفظ می‌نمایند (جدول ۴).

برای تعیین پایداری اثر مهاری مشاهده شـده، اثـر pH روی میـزان فعالیـت ضـدمیکروبی بـه روش رقت‌سازی Broth micro dilution بررسی شد؛ نتایج نشان داد کـه اثـر ضـد میکروبـی مشـاهده شـده، در شرایط اسیدی و قلیایی پایدار است؛ به طوری که، در pH برابـر ۵، ۹۰ درصـد و در pH برابـر ۱۰، تـا ۷۰ درصد فعالیت آن حفظ می‌شود (جدول ۵).

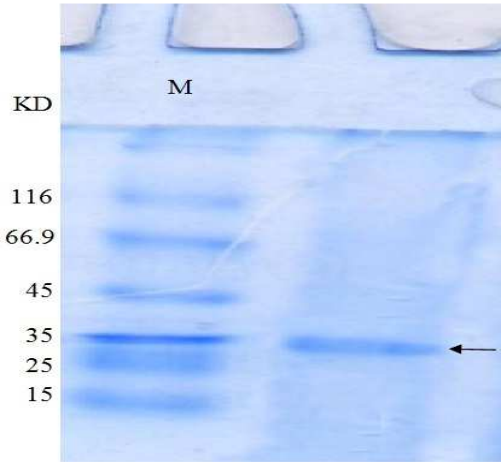
از طرف دیگـر، نتـایج نشـان داد کـه باکتریوسـین تولید شده توسط سویه‌ی DSH20 انتروکوک فاسیوم، در برابر اشعه‌ی UV به طور کامل مقـاوم اسـت و تـا ۳۰ دقیقه این اشعه را با قدرت ۲۰ ژول با حفظ کامل فعالیت خود تحمل می‌کند (جدول ۵).

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

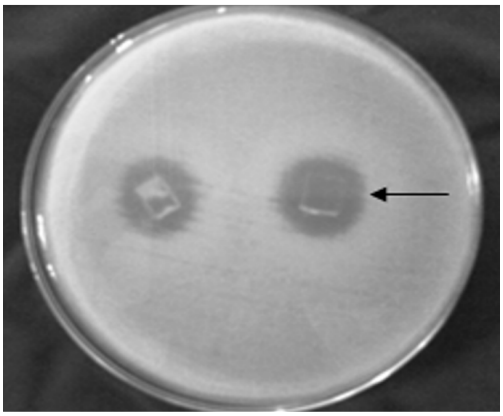
تخمین وزن مولکولی باکتریوسـین جـدا شـده بـه کمک روش SDS-PAGE نشان‌دهنده‌ی یک بانـد بـه وزن حدود ۳۵ کیلودالتون بود (شکل ۳).

همچنین، اثر ضدمیکروبی باکتریوسین تولید شده بر روی ژل پلی‌آکریل آمید نیز تأیید شد؛ هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط قطعـات بـرش یافتـه‌ی ژل بـر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز، در شکل ۴ مشخص است.



شکل ۳. تخمین وزن مولکولی باکتریوسین جدا شده به کمک روش سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل‌آمید ژل الکتروفورز Sodium dodecyl sulfate) SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis

باند به وزن حدود ۳۵ کیلودالتون در سمت راست مشخص است که نشان دهنده‌ی وزن ملکولی باکتریوسین جدا سازی شده است



شکل ۴. بررسی اثر ضدمیکروبی باکتریوسین تولید شده بر روی ژل پلی‌آکریل آمید

هاله‌ی عدم رشد ایجاد شده توسط قطعات برش یافته‌ی ژل بر روی باکتری لیستریا منوسیتوژنز مشخص است.

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 ضدمیکروبی 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 انتروسین‌ها شناخته می‌شوند، در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته‌اند و تا کنون، تعداد زیادی از انتروسین‌ها 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 مهاری بر ضد سویه‌های لیستریا منوسیتوژنز بودند. از این میان، یک سویه‌ی آن‌ها بر ضد هر چهار سویه‌ی لیستریا منوسیتوژنز دارای اثر مهاری بود. امروزه توانایی انتروکوکها در مهار گونه های 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 پومیلی‌سین ۴، که توسط باسیلوس پومیلوس WAPB4 تولید می‌شود، علاوه بر مهار لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس آرئوس و باسیلوس سرئوس، رشد استافیلوکوکوس آرئوس 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 مهاری بر رشد باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و استافیلوکوکوس آرئوس 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 ضدمیکروبی آن شدند؛ این یافته، تأییدی بر پروتئینی بودن ترکیب ضدمیکروبی 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 پومیلی‌سین ۴، Bac14B و توچیسین که به ترتیب توسط باسیلوس پومیلوس، باسیلوس سابتیلیس و باسیلوس تورنجنسیس 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

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 ضدمیکروبی 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 منوسیتوژنز، به طور کامل فعال و به اشعه‌ی UV نیز مقاوم بود.

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 NCBIنیاز دارد.

به عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که خصوصیات بیوشیمیایی ترکیب ضدمیکروبی 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 ضدمیکروبی جایگزین در کنترل عفونت‌های ناشی از لیستریا منوسیتوژنز 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 مسؤولین این مرکز تشکر و قدردانی می‌نماییم.

References

1. Menaa C, Almeidaa G, Carneiroa L, Teixeiraa P, Hogga T, GibbsP. 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, Eungruttanagorn 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 offduced 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.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.04.2013
Vol. 31, No. 236, 2nd Week, July 2013
Accepted: 26.05.2013

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

Dariush Shokri MSc[1], Saeideh Zaghian MSc[2], Hossein Fazeli PhD[3], Sina Mobasherizadeh MSc[4], Behrooz Ataei MD[5]

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