دوره سیزدهم ـ شماره ۴ ـ زمستان ۱۳۹۶
10.22055/ivj.2017.36885.1615

بررسی اثر مهاری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه‌ی LGG 23527 بر روی رشد و بیان ژنی انتروتوکسین A باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC 29213

مهنوش پارسایی‌مهر[۱*]، اشکان جبلی‌جوان[۲] و مریم عزیزخانی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۸

چکیده

افزایش ماندگاری، ایمنی مواد غذایی و ارتقای سلامتی انسان با استفاده از میکرو فلور طبیعی از موضوعات غالب در بهداشت عمومی محسوب می‌شوند. در این تحقیق اثر سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (LGG) با منشاء روده‌ای بر رشد و تولید انتروتوکسین‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و سپس بر بیان ژنی انتروتوکسین A باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، پس از تلقیح این سویه (۱×۱۰^{۷} cfu/ml) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱×۱۰^{۵} cfu/ml) در محیط TSB و گرمخانه‌گذاری در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C، در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، از کشت مخلوط موجود در محیط TSB در محیط‌های اختصاصی کشت و شمارش انجام شد. *استافیلوکوکوس اورئوس بدون* حضور لاکتوباسیلوس به عنوان کنترل گرمخانه-گذاری شد و سپس بررسی تولید انتروتوکسین با استفاده از کیت الیزای ریدااسکرین و همچنین بررسی بیان ژن انتروتوکسین A *استافیلوکوکوس اورئوس* در کشت‌های مخلوط و کنترل به روش RT Real time PCR مطالعه گردید. لاکتوباسیل مورد مطالعه، رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* را نسبت به نمونه‌ی کنترل ۳ لوگ در دمای ۲۵ °C و ۲ لوگ در دمای ۳۵ °C کاهش داد ($P<۰/۰۵$). همچنین تولید انتروتوکسین‌های A، C و E در دمای ۲۵ °C و انتروتوکسین نوع E و A در دمای ۳۵ °C توسط *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* مهار گردید. مقایسه‌ی میزان بیان ژن *sea* بین کشت‌های تیمار و کنترل در دمای ۲۵ °C کاهش معنی‌داری به میزان ۶/۸۲ برابر در بیان ژن نشان داد ($P<۰/۰۵$). در حالی که کاهش معنی‌داری در دمای ۳۵ °C مشاهده نشد. با توجه به اثر کاهشی مشاهده شده در این مطالعه، استفاده از این سویه برای پیشگیری از رشد و تولید توکسین باکتریایی و همچنین جهت بهبود کیفیت و ارتقای سلامتی مواد غذایی پیشنهاد می‌گردد.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، انتروتوکسین A

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن مهم انسانی است که دامنه‌ی وسیعی از بیماری‌ها از جمله سپتی سمی، مننژیت، اندوکاردیت، استئومیلیت و سندرم شوک توکسیک را باعث می‌شود. این باکتری تعداد زیادی از انتروتوکسین‌ها را تولید می‌کند و در میان سموم خارج سلولی، توکسین‌های آن بالاترین میزان خطر را دارند. مسمومیت غذایی استافیلوکوکی ناشی از تولید انتروتوکسین توسط سویه‌های انتروتوکسین‌زا در مواد غذایی از مهم‌ترین مسمومیت‌های غذایی به شمار می‌آید به طوری که از مجموع حدود ۲۴ میلیون مورد کل مسمومیت‌های غذایی گزارش شده در برخی مناطق، ۸/۹ میلیون مورد آن مربوط به *استافیلوکوکوس ارئوس* بوده که بیش از یک سوم کل موارد مسمومیت‌های غذایی را تشکیل می‌دهد. فقدان معیارهای مناسب بهداشتی در طی

[۱*] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه سمنان E-mail: mparsaei@profs.semnan.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۲] استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه سمنان
[۳] استادیار گروه بهداشت موادغذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فن‌آوری‌های نوین آمل

آماده‌سازی غذا، خطر بزرگی جهت آلودگی است و مسمومیت غذایی استافیلوکوکی که اغلب مرتبط با فرآورده‌های غذایی که به طور مستقیم توسط انسان دست‌کاری می‌شوند، هنوز علت مهمی از مسمومیت‌های غذایی در سرتاسر جهان محسوب می‌شود (Adams and Moss 2000, Loir et al. 2003, Otero and Nader-Macias 2006). امروزه بیش از ۱۸ نوع انتروتوکسین استافیلوکوکی شناخته شده که در این میان، انتروتوکسین-های کلاسیک (A، B، C، D، E) نقش بیش‌تری در مسمومیت‌های غذایی دارند. این انتروتوکسین‌ها، اگزوپروتئین‌های مقاوم به حرارت هستند که سندرم گاستروانتریت را در انسان ایجاد می‌کنند. بیش‌ترین توکسین درگیر در مسمومیت‌های غذایی استافیلوکوکی، انتروتوکسین A (SEA) است (Akineden et al. 2008, Even et al. 2009). ژن مولد SEA توسط یک باکتریوفاژ حمل می‌شود که این فاژ درون کروموزوم باکتری یک-پارچه می‌شود و بدین ترتیب ژن انتروتوکسین A نزدیک جایگاه اتصال فاژ قرار دارد. این ژن متشکل از ۷۷۱ جفت باز و کد کننده‌ی یک پیش‌ساز انتروتوکسین A متشکل از ۲۵۷ اسیدآمینه است. انتروتوکسین A از میانه-ی مرحله‌ی لگاریتمی رشد بیان می‌شود و بر خلاف سایر انتروتوکسین‌ها که جهت حداکثر بیان نیاز به عملکرد ژن agr (ژن تنظیمی فرعی) می‌باشند، تحت تأثیر این ژن قرار نمی‌گیرد (Loir et al. 2003). شناخته شده‌ترین سیستم ژنتیکی تنظیم کننده‌ی استافیلوکوکی، *agr* (accessory gene regulator) (Peng et al. 1988)، *Sar* (Staphylococcal accessory regulator) که به SarA، SarS، Sart و SarR تقسیم می‌شود (McCulloch 2006) و *rot* (repressor of toxin) (McNamara et al. 2000) می‌باشد که به طور مستقیم تولید توکسین را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ژنوم فرعی *استافیلوکوکوس اورئوس* دامنه-ی وسیعی از عملکردهای غیرحیاتی سلول شامل ویرولانس، مقاومت دارویی، استفاده از انواع مختلف سوبسترا و متابولیسم مواد گوناگون را کد می‌کند. کلیه‌ی ژن‌های انتروتوکسین‌ها و شبه انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در ژنوم فرعی واقع شده‌اند. این ژنوم معمولاً شامل اجزای متحرک ژنتیکی است که به طور افقی میان سویه‌ها انتقال می‌یابد و گسترش آن میان سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند توانایی آن‌ها را در ایجاد بیماری افزایش داده و در تکامل تدریجی این پاتوژن نقش دارد (Chiang et al. 2008). توجه به سلامت غذا و ارائه‌ی راه‌کارهایی جهت پیش‌گیری از این نوع مسمومیت‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. مهار رشد و مهار تولید انتروتوکسین‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواد غذایی توسط راه‌های غیرآنتی‌بیوتیکی مورد توجه می‌باشد به طوری که بتوان در محصول نهایی با ایجاد تنوع زیستی مناسب و اصلاح اکولوژی میکروبی به این هدف رسید. با اثبات اثر ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک بر برخی از باکتری‌های بیماری‌زا در مطالعات پیشین، کاربرد مناسب و منطقی از باکتری‌های اسید لاکتیک می‌تواند یک استراتژی امیدوار کننده در مبارزه با *استافیلوکوکوس اورئوس* محسوب شود. (Havenaar and Huis In't Veld 1992, Even et al. 2009). باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از تغییر محیط از نظر فیزیکی و شیمیایی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* را تحت تأثیر قرار می‌دهند. عوامل متعددی در این مهار نقش دارند از جمله تولید باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، رقابت تغذیه‌ای و تولید اسید (Salminen et al. 1999, Cotter et al. 2005, Lee et al. 2006, Mezaini et al. 2009). *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* از باکتری‌های بسیار مقاوم روده می‌باشد که اثرات سلامتی بسیاری از جمله کاهش طول مدت اسهال ویروسی، تقویت ایمنی، ترمیم بیماری روده‌ی بزرگ ملتهب، درمان و پیش‌گیری از آلرژی و جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن دارد (Gorbach et al. 1978, Kailasapathy and Rybka 1997, Heikkila and Saris 2003, Walla et al. 2014). از طرفی تا به امروز، مطالعات بسیار اندکی جهت ارزیابی اثر برهم‌کنش باکتری-باکتری در زمینه‌ی بیان فاکتورهای

حدت باکتری استافیلوکوک به ویژه میزان بیان ژنی انتروتوکسین‌ها توسط باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شده است. بنابراین بایستی رهیافت‌های مولکولی به منظور افزایش درک مکانیسم‌های درگیر در مهار رشد *استافیلوکوکوس ارئوس* و بیان عوامل حدت آن در تقابلات کمپلکس میکروبی به کار گرفته شود. در این مطالعه، سعی بر بررسی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه‌ی LGG ۲۳۵۲۷ بر بیان ژنی انتروتوکسین A باکتری بیماری‌زای غذایی مهم یعنی *استافیلوکوکوس ارئوس* شده است.

مواد و روش کار

در این مطالعه، باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* سویه‌ی LGG ۲۳۵۲۷ با منشاء روده‌ی انسانی از دانشگاه تورکو کشور فنلاند و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انتروتوکسین‌زا ATCC ۲۹۲۱۳ از گروه میکروبیولوژی دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید.

جهت تهیه‌ی دوز تلقیح، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به محیط آبگوشت تریپتیک سوی منتقل و به مدت ۱۸ ساعت در ۳۵ °C گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس کشت دومی از این کشت ۱۸ ساعته تهیه و پس از گرم-خانه‌گذاری مقادیر مختلفی از آن به لوله‌های کووت حاوی محیط آبگوشت تریپتیک سوی اضافه گردید. با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوری لوله‌های مذکور خوانده شد. به صورت همزمان از محتویات این لوله‌ها شمارش باکتریایی به روش Pour plate انجام گردید و در آخر جذب نوری در لوله‌ی کووت حاوی تقریباً 10^7 cfu/ml باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مشخص شد و سپس با استفاده از رقت‌سازی دوز تلقیح مورد نظر 10^5 cfu/ml از *استافیلوکوکوس اورئوس* به دست آمد.

به طور مشابه تمامی این مراحل برای جدایه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در محیط آبگوشت MRS انجام گرفت. محیط مذکور در دمای ۳۵ °C به مدت ۱۸ ساعت بدون دست‌کاری در اتمسفر حاوی ۱۰-۸ درصد CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند و سپس رقت حاوی 10^7cfu/ml از آن‌ها تهیه گردید.

آماده‌سازی کشت مخلوط سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با *استافیلوکوکوس اورئوس*، مطابق با روش Laughton و همکاران در سال ۲۰۰۶ با کمی تغییر انجام گرفت. ابتدا سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در لوله‌ی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آبگوشت تریپتیک سوی کشت داده (10^7 cfu/ml) و سپس یک میلی‌لیتر از آبگوشت حاوی 10^6 cfu/ml از *استافیلوکوکوس اورئوس* به لوله‌های کشت حاوی سویه‌های پروبیوتیک اضافه گردید تا غلظت نهایی 10^5 cfu/ml از این باکتری به دست آید. آنگاه دو لوله حاوی کشت لاکتوباسیلوس و *استافیلوکوکوس اورئوس* (کشت مخلوط) به مدت ۲۴ ساعت هم‌زمان در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. ضمناً لوله‌ی آبگوشت تریپتیک سوی حاوی 10^5 cfu/ml *استافیلوکوکوس اورئوس* و فاقد سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به عنوان کنترل نیز تحت همان شرایط تهیه و گرم‌خانه‌گذاری شد. جهت شمارش میزان *استافیلوکوکوس اورئوس* در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از کشت‌های مخلوط و کنترل فوق نمونه تهیه گردید و پس از آماده‌سازی (تهیه رقت) در محیط‌های برد پارکر (کیولب ایتالیا) برای شمارش *استافیلوکوکوس اورئوس* و آگار MRS (کیولب ایتالیا) برای شمارش لاکتوباسیلوس‌ها به روش کشت سطحی کشت داده شدند.

برای بررسی توانایی انتروتوکسین‌زایی *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط کشت مخلوط با پروبیوتیک و کنترل از کیت RIDASCREEN SETA, B, C.D.E که یک آزمون الایزای ساندویچی (شرکت بیوفارم) برای تشخیص انتروتوکسین‌های A الی E در غذاهای مایع و جامد و همچنین عصاره‌ی محیط‌های کشت می‌باشد، استفاده گردید. این کیت قادر است تا با توجه به نوع غذایی که

مورد آزمایش قرار می‌گیرد میزان ۰/۷-۰/۲ نانوگرم از سم را در هر میلی‌لیتر از نمونه ردیابی کند.

بررسی تأثیر جدایه‌ی لاکتوباسیل بر بیان ژن انتروتوکسین A به روش Real Time PCR انجام شد. در ابتدا محیط‌های کشت مخلوط و کنترل در دور ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند تا رسوب سلولی حاصل گردد. سپس، استخراج RNA از پلت باکتریایی با استفاده از محلول جداسازی Tripure (Roche Applied Science, Germany) مطابق با دستورالعمل صورت گرفت. به منظور بررسی کیفیت RNAهای استخراج شده از نانودراپ (NanoDrop 1000 spectrophotomete Thermo Scientific) با اندازه‌گیری نسبت جذب ۲۸۰/۲۶۰ استفاده شد. غلظت آن بر اساس نانوگرم سنجیده شد. میزان ng ۱/۵-۱ از RNA استخراج شده از کشت‌های مخلوط و کنترل جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (شرکت فرمنتاز) و پرایمرهای هگزامر طبق دستورالعمل کیت استفاده گردید. برای هر نمونه کنترل فاقد آنزیم ترانس‌کریپتاز یا negative (RT-) minus Reverse Transcriptase control برای بررسی آلودگی با DNA در نظر گرفته شد. سنتز cDNA در یک ترموسایکلر حرارتی DNA موتور ABI (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A) با شرایط زیر انجام شد: ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C ، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ °C و به دنبال آن، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ °C . به طور خلاصه ۱/۵-۱ نانوگرم از RNA همراه با ۱ میکرولیتر پرایمر هگزامر (10pmol/µl)، ۲ میکرولیتر dNTP (۱۰mM)، ۴ میکرولیتر بافر 5X، ۱ میکرولیتر ریبولاک RNase inhibitor20 U / میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس RevertAidTM M-MuLV معکوس کریپتاز (۲۰۰ U در میکرولیتر) مخلوط گردید.

یک میکرولیتر cDNA به عنوان الگو جهت تکثیر به روش Real Time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ میکرولیتر مستر میکس PCR همراه با رنگ فلورسانت SYBR Green II مربوط به شرکت Primer design ، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر و ۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. در این مطالعه 16s rRNA به عنوان ژن رفرانس انتخاب گردید. توالی پرایمرهای ژن-های هدف و کنترل در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش Real Time PCR در شرایط زیر انجام گردید: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه و به دنبال آن ۴۰ سیکل از مراحل دناتوراسیون در دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه، چسبیدن پرایمرها در دمای ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و سپس آنالیز منحنی ذوب در دمای ۶۵- ۹۵ درجه‌ی سانتی-گراد (سرعت انتقال حرارت 0.1°C/sec) در دستگاه Rotorgene-6000 corbett اجرا گردید. این روش، میزان قطعه‌ی تولید شده را در طول هر سیکل از تکثیر (با سنجش فلورسانت) اندازه‌گیری می‌کند. جهت نرمالیزه کردن داده‌های به دست آمده و مقایسه‌ی میزان بیان نسبی ژن *sea* میان نمونه‌های تیمار و غیرتیمار در مقابل بیان یک ژن رفرانس، مانند 16sr RNA محاسبه گردید (Young-Duck et al. 2007). کل آزمایش سه بار تکرار گردید.

نمودارهای مربوط به رشد باکتری با نرم‌افزار Graphpad prism 4 ترسیم شد و کلیه‌ی تحلیل‌های آماری بین لگاریتم تعداد باکتری‌ها در زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) و همچنین شیب خط منحنی‌های رشد در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 صورت گرفت. جهت مقایسه‌ی داده‌ها از تست One-way ANOVA همراه با تست تکمیلی Tukey استفاده شد و اختلاف میانگین داده‌ها در سطح ۵ درصد از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد. برای آنالیز داده‌های Real Time PCR از نرم‌افزار REST 2009 استفاده شد.

جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده در RT Real Time PCR

Primer	Sequence (5'→3')	Amplicon length (bp)	T_m (ºC)	Reference
sea-F *sea* -R	TTGGAAACGGTTAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	55	Lee et al., 2007
16S rRNA-F *16S rRNA*-R	CCGCCTGGGGAGTACG AAGGGTTGCGCTCGTTGC	240	54	Lee et al.,2007

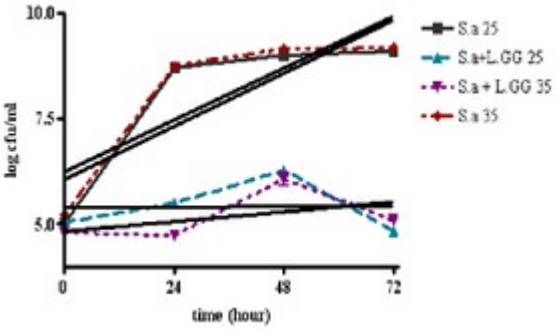
نتایج

بررسی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور LGG در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C

نمودار ۱ میزان رشد و همچنین شیب خطی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (LGG) و بدون حضور سویه‌ی مذکور را به ترتیب در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C نشان می‌دهد. تحلیل آماری روی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در نمودار ۱ نشان داد که در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C از ساعت ۲۴ گرم‌خانه‌گذاری تا پایان آزمایش، میزان باکتری در گروه کنترل بیش‌تر از گروه‌های تیمار بود ($p<۰/۰۰۱$) و مشابه با همین نتیجه مقایسه‌ی شیب خطی رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که روند افزایشی تعداد باکتری در گروه‌های کنترل (با شیب ۰/۰۱±۰/۰۵۲ در دمای ۲۵ °C و ۰/۰۱±۰/۰۵۱ در دمای ۳۵ °C) به طور معنی‌دار بیش‌تر از گروه محتوی LGG در دو دمای ۲۵ °C (با شیب ۰/۰۰۶±۰/۰۰۰۶) و ۳۵ °C (با شیب ۰/۰۰۵±۰/۰۰۹) بود ($p<۰/۰۰۱$).

جدول ۲: مقایسه انتروتوکسین زایی *استافیلوکوکوس ارئوس* در کشت مخلوط و کنترل جدایه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

	کشت کنترل			کشت مخلوط		
دمای گرمخانه گذاری	SEA	SEC	SEE	SEA	SEC	SEE
۲۵ °C	+	+	+	-	-	-
۳۵ °C	+	-	+	-	-	-



نمودار ۱: منحنی لگاریتم رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور باکتری LGG و کشت کنترل در دو دمای ۲۵ و ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

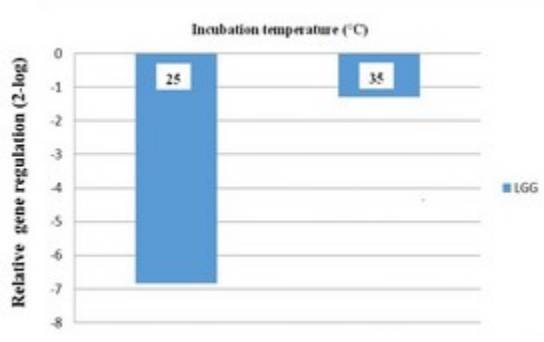
در مقایسه‌ی بین رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* همراه با LGG در ساعات مختلف در دو دمای ۲۵ °C و ۳۷ °C دیده شد که تنها در ساعت ۲۴ آزمایش گروه محتوی LGG در دمای ۳۵ °C به طور معنی‌دار مؤثرتر از دمای ۲۵ °C از رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت کرد ($P=۰/۰۰۲$) ولی در ساعات ۴۸ و ۷۲ آزمایش اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه دیده نشد ($p>۰/۰۵$). مقایسه‌ی شیب خطی رشد نیز اختلاف آماری معنی‌داری را بین روند رشد گروه‌های محتوی LGG در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

تأثیر بر تولید توکسین

بررسی اثر ممانعت کنندگی سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر تولید انواع انتروتوکسین *استافیلوکوکوس اورئوس* در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C نشان داد که نمونه‌ی مربوط به کنترل استافیلوکوکوس که در دمای ۲۵ °C از نظر انتروتوکسین‌های A، C، E مثبت بوده و سویه‌ی لاکتوباسیلوس توانست در این دما در محیط کشت مخلوط تولید این انتروتوکسین‌ها را مهار کنند. همین طور با بررسی نمونه‌ی مربوط به کنترل *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۳۵ °C مشاهده شد که این نمونه از نظر حضور انتروتوکسین‌های A و E مثبت بود که در این دما سویه‌ی لاکتوباسیلوس به خوبی توانست تولید انتروتوکسین نوع A و E را مهار کند.

بیان ژن

مقایسه‌ی دمایی میزان بیان ژن *sea* در کشت مخلوط در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C در نمودار ۲ نشان داده شده است. میزان بیان ژن *sea* در دمای ۲۵ °C نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری نشان داد و این کاهش بیان به میزان ۶/۸۲ برابر محاسبه شد (P=۰/۰۱۸). در حالی که در دمای ۳۵ °C تفاوت معنی‌داری نسبت به کنترل مشاهده نگردید (P=۰/۲۷).



نمودار ۲: مقایسه نمودار مربوط به تغییرات بیان ژن *sea* در هر دو دمای ۳۵ و ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد

بحث

سلامت غذا یک مسأله‌ی بنیادی چه از دیدگاه مصرف کننده‌ی مواد غذایی و چه از دیدگاه تولیدکنندگان مواد غذایی بوده است و با عنایت به گزارش موارد متعدد مسمومیت غذایی استافیلوکوکی حاصل از مواد غذایی آلوده و اهمیت سموم استافیلوکوکی در بهداشت عمومی، توجه به سلامت غذا و ارائه‌ی راه‌کارهایی جهت پیش-گیری از این نوع مسمومیت‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. مطالعات بسیار کمی جهت ارزیابی اثر باکتری‌های اسید لاکتیک بر فاکتورهای حدت *استافیلوکوکوس اورئوس* در سطح بیان ژنی صورت گرفته است و اثرات این عوامل روی تنظیم بیان ژنی انتروتوکسین‌های باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* که یکی از مهم‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت غذایی در جهان است بسیار اندک می‌باشد (Adams and Moss 2000). لاکتوباسیلوس‌ها جزء فلور دستگاه گوارش (روده) و دستگاه تناسلی (واژن) انسان بوده و یکی از اجزای تشکیل دهنده‌ی میکروفلور طبیعی بدن انسان و حیوان به شمار می‌روند (Salminen et al. 1999). مطالعاتی در ارتباط با تأثیر برخی سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک بر رشد و تولید توکسین باکتری *استافیلوکوکوس ارئوس* و سایر پاتوژن‌های غذایی صورت گرفته است (Trollet and Frazier 1963, Boyle et al. 2006, Akineden et al. 2008, Charlier et al. 2009). در مطالعات گوناگون، تأثیر پروبیوتیک‌ها به خصوص لاکتوباسیل‌ها روی پاتوژن‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. در ضمن، گزارش‌های زیادی نیز بر نقش این باکتری‌ها در پیش‌گیری از سرطان وجود دارد. لی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که مصرف *لاکتوباسیلوس رامنوسوس جی جی* باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های مدفوعی بتا – گلوکورونیداز، نیتروردوکتاز و هیدرولاز اسید گلیکو کولیک در زنان سالم می‌شود (Lee et al. 2003, Lee and Salminen 2009). طبق برخی گزارش‌ها، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، رشد پاتوژن‌هایی مثل *لیستریا مونوسایتوژنز*،

سالمونلا اینتریتیدیس، اشرشیاکلای، باسیلوس سرئوس، کلستریدیوم پرفرژینس و یرسینیا انتروکولیتیکارا در آگار حاوی ۲ درصد گلوکز مهار کرد (Charteris et al. 1997, Coconnier et al. 1998, Floch 2002, Caglar et al. 2005, Carey et al. 2008, Charlier et al. 2009). در تحقیقات مختلف مکانیسم‌های احتمالی اثرات آنتاگونیستی لاکتوباسیلوس‌ها بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* را موارد متعددی ذکر کردند که عبارتند از: رقابت تغذیه‌ای، تولید باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، اسیدهای چرب و کاهش pH (Mezaini et al. 2009, Kazemi Darsanaki et al. 2012). در گزارش دیگر متاکسوپولوس و همکاران در سال ۱۹۸۱ دزهای تلقیح متفاوت از *استافیلوکوکوس اورئوس* و لاکتوباسیل‌ها را در گوشت آزمایش کردند و به این نتیجه رسیدند که نسبت لاکتوباسیل‌ها به *استافیلوکوکوس اورئوس* با اثر ممانعت-کنندگی لاکتوباسیل‌ها بر این پاتوژن ارتباط دارد. افزون بر این، درجه‌ی حرارت هم عامل مؤثر در میزان اثرگذاری بیان شد. ترولر، فرازیر (۱۹۶۳) و هاینز و هارمون (۱۹۷۳) اثر مثبت حرارت زیر ۳۰ °C در ممانعت‌کنندگی لاکتوباسیل‌ها در شیر بر *استافیلوکوکوس ارئوس* را در تحقیقات خود تأیید نمودند. در مطالعه‌ی حاضر هم لاکتوباسیلوس در دمای ۲۵ °C اثر ممانعت‌کنندگی بهتری در مقایسه با دمای ۳۵ °C از خود نشان دادند. در ۲۵ °C کاهش لوگ کاملاً مشخص بود و در ۳۵ °C نیز با کاهشی کم‌تری همراه بود. *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در دمای ۲۵ °C حدود ۳ لوگ، و در ۳۵ °C نیز حدوداً ۲ لوگ کاهش را نشان دادند. بنابراین تأثیر دما، به عنوان عامل مؤثر در اثر ممانعت کنندگی پروبیوتیک‌ها بر *استافیلوکوکوس ارئوس* نیز در این تحقیق تأیید شد. طهمورث‌پور و همکاران در سال ۱۳۸۶ در تحقیقی در زمینه‌ی تأثیر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر اتصال استرپتوکوک‌های دهانی در شرایط آزمایشگاه پرداختند. وی به بررسی *استرپتوکوکوس موتانس* و سایر استرپتوکوک‌های دهانی جدا شده از نمونه‌های پلاک و پوسیدگی‌های افراد داوطلب پرداخت. نتایج نشان‌دهنده‌ی کاهش اتصال استرپتوکوک‌ها در حضور پروبیوتیک بود. در زمانی که سویه‌ی پروبیوتیک قبل از استرپتوکوک‌ها وارد سیستم شده بود کاهش اتصال بیش‌تر بود. این کاهش، احتمالاً به دلیل کلونیزه شدن جایگاه‌های اتصال به وسیله‌ی پروبیوتیک قبل از ورود استرپتوکوک و میان-کنش باکتری‌ها می‌باشد. سالواتیرا و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثر *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در ماست در ۲ غلظت ۱×۱۰^{۹} و ۱×۱۰^{۷} cfu/g، روی رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* پرداختند و مشاهده کردند که pH و جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در طول آزمایش ثابت بوده و جمعیت *استافیلوکوکوس اورئوس* در ماست حاوی این پروبیوتیک‌ها در هر دو غلظت طی مدت ۸ روز به سطحی غیرقابل تشخیص کاهش پیدا کرده، اما در ماست بدون پروبیوتیک حتی ۲۴ روز پس از تلقیح استاف، باز هم *استافیلوکوکوس ارئوس* قابل تشخیص بود. آمور و همکاران در سال ۲۰۰۶ طی مطالعه‌ای، فعالیت آنتی‌باکتریال عوامل باکتریایی اسید لاکتیک در گوشت به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های اسید لاکتیک (*لاکتوکوکوس لاکتیس*[1]، *لاکتوکوکوس گارویه*، خانواده‌ی لاکتوباسیلوس، خانواده‌ی لوکونوستوک[2] و انتروکوکسی[3]) در کنترل *استافیلوکوکوس ارئوس* از طریق کاهش pH و تولید باکتریوسین نقش دارند. Sameshima و همکاران در سال ۱۹۹۸ پس از بررسی تأثیر لاکتوباسیلوس‌های روده‌ای شامل (*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* FERMP-15120 و *لاکتوباسیل پاراکازئی* تحت گونه‌ی پاراکازئی FERMP-15121 و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* FERMP-15119) و سویه‌ی تجاری *لاکتوباسیلوس ساکئی* روی رشد و تولید انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* در دو دمای ۲۰ و ۳۵ °C در فرایند ساخت سوسیس، مشاهده کردند که *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس ساکئی*، در دمای ۲۰ °C نسبت به ۳۵ °C

1- *Lactococcus lactis*
2- Loconostoc spp
3- Entrococcus spp

اثر بیش‌تری بر کاهش رشد و تولید انتروتوکسین *استافیلوکوکوس ارئوس* طی فرآیند تخمیر داشتند که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی داشته است. در تحقیق حاضر نیز تولید انتروتوکسین E و C و A باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط جدایه‌ی لاکتوباسیل در دو دمای ۲۵ و ۳۵ °C به پایین‌تر از میزان cut off value رسید. مطالعات کمی در زمینه‌ی تأثیر *استافیلوکوکوس اورئوس* در تقابلات با سایر میکروارگانیسم‌ها در سطح مولکولی صورت گرفته است. Loughton و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش دادند که *لاکتوباسیلوس روتری* یک ترکیب کوچک قابل حل تولید می‌کند که قادر به تداخل با بیان یک ژن اگزوتوکسین در *استافیلوکوکوس اورئوس* است. Lee و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که احتمال خطر مسمومیت استافیلوکوکی را می‌توان بر پایه‌ی بیان ژنی در سطح mRNA ارزیابی کرد. Carey و همکاران در سال ۲۰۰۸ تأثیر پروبیوتیک‌ها و اسیدهای آلی را روی بیان ژنی شیگاتوکسین *Escherichia coli* O157:H7 بررسی کردند. در این مطالعه بیش‌ترین کاهش بیان ژن stx2A مولد شیگاتوکسین با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم ترموفیلوس* و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* و در میان اسیدهای آلی، اسید استیک نشان داد. Even و همکاران در سال ۲۰۰۹ در مطالعه‌ای اثر تقابلی باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* بر رشد و بیان فاکتورهای حدت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۳۰ °C بررسی کردند که قادر به تداخل و کاهش در بیان ژن‌های تنظیمی از جمله *agr* و همچنین برخی ژن-های مولد انتروتوکسین *sea* و *seg* می‌باشد که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی داشته است.

بدین ترتیب تأثیر *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (LGG) بر کاهش رشد و تولید انتروتوکسین‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و همچنین اثر کاهشی آن در سطح مولکولی در کاهش بیان انتروتوکسین A نشان داده شد . علاوه بر این، کاربرد این سویه‌ی لاکتوباسیل به عنوان یک عامل مهارگر طبیعی در برابر پاتوژن‌ها به منظور حفظ کیفیت و ارتقای سلامتی در فراورده‌های غذایی مورد توجه می‌باشد.

منابع

طهمورث‌پور، آرزو؛ کسری‌کرمانشاهی، روحا؛ صالحی، رسول و نبی‌نژاد، عبدالرضا (۱۳۸۶). تأثیر پروبیوتیک لاکتوباسیوس فرمنتوم بر اتصال استرپتوکوک‌های دهانی در شرایط آزمایشگاه. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران، جلد ۲، شماره ۱، صفحات ۵۴-۵۱.

Adams, M.R. and Moss, M.O. (2000). "Staphylococcal enterotoxins", in Adams, M.R.(Ed), Food Microbiology 2th Edition Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, Pp: 54-64 and 253-259.

Akineden, O.; Hassan, A.A.; Schneider, E. and Usleber, E. (2008). Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 124(2): 211-216.

Ammor, S.; Tauveron, G.; Dufour, E. and Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility. 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control, 17(6): 454-461.

Boyle, R.J.; Robins-Browne, R.M. and Tang, M.LK. (2006). Probiotic use in clinical practice: what are the risks? American Journal of Clinical Nutrition, 83(6): 1256-1264.

Caglar, E.; Kargul, B. and Tanboga, I. (2005). Bacteriotherapy and probiotics, role on oral health: Oral Disease: 11(3): 131-137.

Carey, C.M.; Kostrzynska, M.; Ojha, S. and Thompson, S. (2008). The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Journal of Microbiological Methods, 73(2): 125-132.

Charlier, C.; Cretenet, M.; Even, S. and Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: an old story with new perspectives. International Journal of Food Microbiology, 131(1): 30-39.

Charteris, W.P.; Kelly, P.M.; Morelli, L. and Collins, J.K. (1997). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spieces in mixed bacterial populations. International Journal of Food Microbiology, 35(1): 1-27.

Chiang, Y.C.; Liao, W.W.; Fan, C.M.; Pai, W.Y.; Chiou, C.S. and Tsen, H.Y. (2008). PCR detection of staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. International Journal of Food Microbiology, 121(1): 66-73.

Coconnier, M.H.; Lievin, V.; Hemery, E. and Servin, A.L. (1998). Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Applied and Environmental Microbiology, 64(11): 4573-4580.

Cotter, P.D.; Hill, C. and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, 3(10): 777-788.

Even, S.; Charlier, C.; Nouaille, S.; Ben Zakour, N.L.; Cretenet, M.; Cousin, F.J. et al. (2009). *Staphylococcus aureus* virulence expression is impaired by *Lactococcus lactis* in mixed cultures. Applied and Environmental Microbiology, 75(13): 4459-4472.

Floch, M.H. (2002). Bile salts, intestinal microflora and entro hepatic circulation. Digestive and Liver Disease, 34: S54-S57.

Gorbach, S.L.; Chang, T.W. and Goldin, B. (1987). Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. The Lancet, 330(8574): 1519.

Haines, W.C. and Harmon, L.G. (1973). Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. Applied Microbiology, 25(2): 169-172.

Havenaar, R. and Huis In't Veld, J.H.J. (1992). Probiotics: A general view. In: Wood BJB, Ed. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. Vol 1. Amsterdam: Elsev. Applied Science Publication, 151-170.

Heikkila, M.P. and Saris, P.E.J. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. Journal of Applied Microbiology, 95(3): 471-478.

Kailasapathy, K. and Rybka, S. (1997). *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* Spp., their therapeutic, potential and survival in yogurt. Australian Journal of Dairy Technology, 52(1): 28-35.

Kazemi Darsanaki, R.; Laleh Rokhi, M.; Azizollahi, M. and Issazadeh, K. (2012). Antimicrobial activities of lactobacillus strains isolated from fresh vegetables. Middle-East Journal of Science Research, 11(9): 1216-1219.

Laughton, J.M.; Devillard, E.; Heinrichs, D.E.; Reid, G. and McCormick, J.K. (2006). Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. Microbiology, 152(4): 1155-1167.

Lee, Y.K.; Puong, K.Y.; Ouwehand, A. and Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from muco- 2 cell surface by lactobacilli. Journal of Medical Microbiology, 52(10): 925-930.

Lee, D.H.; Park, B.J.; Lee, M.S.; Choi, J.B.; Kim, J.K.; Park, J.H. and Park, J.C. (2006). Synergistic effect of *Staphylococcus aureus* and LPS on silica-induced tumor necrosis factor production in macrophage cell line J774A. Journal of Microbiology and Biotechnology, 16(1):136-140.

Lee, Y.K. and Salminen, S. (2009). Handbook of Probiotics and Prebiotics. 2th edition, 9-30.

Lee, Y.D.; Moon, B.Y.; Park, J.H.; Chang, H.I. and Kim, W.J. (2007). Expression of entrotoxin genes in staphylococcus aureus isolates based on mRNA analysis. Journal of Microbiology and Biotechnology, 17(3): 461-467.

Loir, Y.L.; Baron, F. and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus and* food poisoning. Genetic molecular research, 2(1): 63-76.

McCulloch, J.A. (2006). Avaliação da funcionalidade do locus acessory gene regulator (*agr*) em cepas de *Staphylococcus aureus* brasileiras com suscetibilidade reduzida aos glicopeptídeos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

McNamara, P.J.; Milligan-Monroe, K.C.; Khalili, S. and Proctor, R.A. (2000). Identification, cloning, and initial characterization of rot, a locus encoding a regulator of virulence factor expression in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 182(11): 3197-3203.

Metaxopoulos, J.; Genigeorgis, C.; Fanelli, M.J.; Franti, C. and Cosma, E. (1981). Production of Italian dry salami: effect of starter culture and chemical acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. Applied and Environmental Microbiology, 42(5): 863-871.

Mezaini, A.; Chihib, N.E.; Dilmi Bouras, A.; Nedjar-Arroume, N. and Hornez, J.H. (2009). Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an Algerian dairy product. Journal of Environmental Public Health; Article ID 678495, P:1-6.

Mohammedsaeed, W.; McBain, A.J.; Cruichshank, S.M. and O'Neill, C.A. (2014). *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibits the toxic effects of *Staphylococcus aureus* on epidermal keratinocytes. Applied and Environmental Microbiology, 80(18): 5773-5781.

Otero, M.C. and Nader-Macias, M.E. (2006). Inhibition of *staphylococcus aureus* by H_2O_2-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. Animal Reprod Science, 96(1-2): 35-46.

Peng, H.L.; Novick, R.P.; Kreiswirth, B., Kornblum, J. and Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology, 170(9): 4365- 4372.

Salminen, S.; Ouwehand, A.; Benno, Y. and Lee, Y.K. (1999). Probiotics: how should they be defined? Trends in Food Science Technology, 10(3): 107-110.

Salvatierra, M.; Molina, A.; Gamboa Mdel, M. and Arias, M.L. (2004). Evaluation of the effect of probiotic cultures on two different yogurt brands over a known population of *Staphylococcus aureus* and the production of thermonuclease. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, 54(3): 298-302.

Sameshima, T.; Magome, C.; Takeshita, K.; Arihara, K.; Itoh, M. and Kondo, Y. (1998). Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behavior of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. International Journal of Food Microbiology, 41(1):1-7.

Troller, J.A. and Frazier, W.C. (1963). Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. I. Effect of environmental factors on inhibition. Applied Microbiology, 11(1): 11-14.

The inhibitory effect of *Lactobacillus rhamnosus* LGG 23527on growth and enterotoxin A gene expression of *S. aureus* ATCC 29213

Parsaeimehr, M.[1]; Jebellijavan, A.[1] and Azizkhani, M.[2]

Received: 07.05.2016 Accepted: 06.02.2017

Abstract

Increase shelf life, food safety and human health improvement by using the natural microflora are the dominant issues in public health. In this research, the effect of *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) isolate with intestinal origin was studied on growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* and then, *Staphylococcus aureus* enterotoxin A gene expression was evaluated in a laboratory media. Therefore, this strain ($1*10^7$ cfu / ml) and *Staphylococcus aureus* ($1*10^5$ cfu / ml) were inoculated in TSB and incubated in two temperatures at 25 and 35°C, at the time of zero, 24, 48 and 72 hours, the mixed cultures were counted in specific media. *Staphylococcus aureus* without lactobacillus was incubated as control and then enterotoxin production evaluated by using ELISA kit and the gene expression of the SEA of *S. aureus* in mixed and control cultures was also evaluated by RT Real Time PCR technique. The lactobacillus isolates decreased *Staphylococcus aureus* growth compared to control samples 3 log at 25°C and 2 log at 35°C. The enterotoxin production of A, C and E at 25° and enterotoxin type E and A at 35°C was inhibited by *Lactobacillus rhamnosus*. Comparison of gene expression SEA between treated and control cultures showed the gene expression of the SEA was significantly suppressed 6.82 fold in *S. aureus* co cultured with studied lactobacillus isolate at 25°C while it was not significant to 35 °C ($P<0.05$). Because of the reduced effects of the isolates seen in this study, proposed it for natural prevention of bacterial growth/toxin production in foods to improve the quality and safety of the foods.

Key words: *L. rhamnosus GG*, Enterotoxin A, Gene expression, *S. aureus*

1- Assistant Professor, Department Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran

2- Assistant Professor, Department Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

Corresponding Author: Parsaeimehr, M., E-mail: mparsaei@profs.semnan.ac.ir