مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۹، شماره ۹، آذر ۱۴۰۱ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی باسیلوس سرئوس در سبزیجات خشک فله و بسته‌بندی شده به روش کشت و PCR

محمد مهدی سلطان دلال: استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی/ بخش میکروب‌شناسی غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
(* نویسنده مسئول) msoltandallal@gmail.com

فریبا نباتچیان: دانشیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

سارا شریفی یزدی: دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

شبنم حقیقت خواجوی: استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

مهدیه پورمرادیان: کارشناس، بخش میکروب‌شناسی غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: تغییر شیوه تغذیه و سبک زندگی در سال‌های اخیر، باعث اهمیت بیشتر به کیفیت سبزیجات خشک مصرفی و ارزیابی سلامت در آن‌ها شده است. سبزیجات خشک محل مناسبی برای ماندگاری باکتری *باسیلوس* به دلیل داشتن اسپور می‌باشد. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی *باسیلوس سرئوس* در سبزیجات خشک فله و بسته‌بندی شده به روش کشت و PCR بود.

روش کار: در یک مطالعه توصیفی مقطعی از بهمن ۹۸ الی مهر ۹۹، تعداد ۱۶۰ نمونه سبزی خشک شامل ۸۰ نمونه فله و ۸۰ نمونه بسته‌بندی شده آماده مصرف از نظر آلودگی به *باسیلوس سرئوس* مورد ارزیابی قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا ۲۵ گرم از نمونه در ۲۲۵ میلی‌لیتر پپتون واتر ریخته شد، سپس یک میلی‌لیتر از رقت ۰/۱ سوسپانسیون تهیه شده بر روی محیط اختصاصی *باسیلوس سرئوس* (MYP Agar) تلقیح شد. در روز بعد کلنی‌ها از نظر واکنش‌های بیوشیمیایی طبق روش‌های استاندارد مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور بررسی مولکولی این باکتری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن‌های انتخابی انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون کای اسکوئر و نرم‌افزار SPSS استفاده شده و موارد $P<0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که ۳۴ نمونه (۲۱/۲۵ درصد) با روش فنوتیپی از سبزی خشک‌ها دارای آلودگی مشکوک به باسیلوس سرئوس بودند. با مطالعه ژن ITS، همه ۳۴ جدایه *باسیلوس سرئوس* شناسایی شدند. سبزی شوید با ۷ مورد (۴/۳۷ درصد) بیشترین آلودگی را داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به مقاومت بالای اسپور *باسیلوس سرئوس* در برابر حرارت، این باکتری می‌تواند در فرایند خشک کردن سبزی زنده مانده و برای مصرف‌کنندگان ایجاد مسمومیت غذایی کند.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

کلیدواژه‌ها

باسیلوس سرئوس،
سبزی خشک،
مسمومیت غذایی،
روش مولکولی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۹
تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

شیوه استناد به این مقاله:

Soltan Dallal MM, Nabatchian F, Sharifi-Yazdi S, Haghighat Khajavi S, pourmoradian M. Isolation and Identification *of Bacillus cereus* of Dry Bulk and Packaged Vegetables by Culture and PCR. Razi J Med Sci. 2022;29(9):31-40.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

Razi Journal of Medical Sciences. 2022;29(9):31-40. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Isolation and Identification *of Bacillus cereus* of Dry Bulk and Packaged Vegetables by Culture and PCR

Mohammad Mehdi Soltan Dallal: Professor, Food Microbiology Research Center/ Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (* Corresponding author) msoltandallal@gmail.com
Fariba Nabatchian: Associate Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Sarah Sharifi-Yazdi: Medical Student, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
Shabnam Haghighat Khajavi: Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch,Islamic Azad University,Tehran, Iran
Mahdieh pourmoradian: BSc, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background & Aims: *Bacillus cereus* is a Gram-positive, rod-shaped, facultative anaerobic, motile, beta-hemolytic, spore forming bacterium commonly The bacteria is commonly found in the environment, is often found in soil and vegetation, and can be present in foods. It can cause foodborne illness worldwide. *B. cereus* illness is related to many foods - beef, turkey, rice, beans, and vegetables. Specifically, the diarrheal illness is often related to meats, milk, vegetables, and fish. This product may be contaminated with many bacterial pathogens, including *Bacillus cereus* (4). There are several ways to store vegetables; one way is drying, which is important for several reasons: long-term storage, reducing the volume for the storage, and move products more easily and faster The emetic-type illness is most often associated with rice products, but it has also been associated with other types of starchy products such as potato, pasta, and cheese products (5). Some food-mixtures (sauces, puddings, soups, casseroles, pastries, and salads, have been associated with food-borne illness in general. There are two types of food-borne *B. cereus* illness. In the first, contaminated food (many types of food, often left at room temperature) makes its way to the small intestine where the toxin, in this case, a large-molecular-weight protein, is released. This can lead to diarrhea, cramps, and sometimes nausea. Usually, vomiting is not present in this form of illness (6, 7). Incubation for the first type is 6 to 15 hours. In the second type, affected food, most often starchy food, and classically, rice, contains a different type of toxin (cereulide, an ionophoric low-molecular-weight dodecadepsipeptide that is pH-stable and heat and protease-resistant). This toxin causes emetic-type *B. cereus* illness. The incubation period for this type is 30 minutes to 6 hours (9). *Bacillus cereus* is caused by the ingestion of food contaminated with either the enterotoxigenic *B. cereus* or with the emetic toxin. In non-gastrointestinal illness, reports of respiratory infections similar to respiratory anthrax have been attributed to *B. cereus* strains harboring *B. anthracis* toxin genes (10).
The spore of this bacterium is resistant to severe environmental conditions including heat, freezing, drying, and radiation, and may be considered an infectious agent for this bacterium. Changes in diet and lifestyle in recent years and the growing trend of using ready-made products (4). In the gastrointestinal tract (small intestine), vegetative cells, ingested as viable cells or spores, produce and secrete a protein enterotoxin and induce a diarrheal syndrome, whereas emetic toxin, a plasmid-encoded cyclic peptide (cereulide), is produced in food products and ingested as a formed toxin. Dry vegetables it is suitable for the survival quickly multiply at room temperature (12). There are two main types of intestinal illnesses caused by *B. cereus.* One is diarrheal, and one leads more to nausea/vomiting. *B. cereus* has also been implicated in infections of the eye, respiratory tract, and in wounds. The pathogenicity of *B. cereus*, whether intestinal or nonintestinal, is intimately associated with the production of

Keywords
Bacillus cereus,
Dried vegetables,
Food poisoning,
Molecular method

Received: 10/09/2022
Published: 10/12/2022

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

tissue-destructive exoenzymes. Among these secreted toxins are four hemolysins, three distinct phospholipases, an emesis-inducing toxin, and proteases. The specific name, cereus, meaning "waxy" in Latin, refers to the appearance of colonies grown on blood agar.*Bacillus cereus* is one of the most important causes of spore-bearing bacteria such as Bacillus (5, 7, 11). The aim of this study was to isolate and identify *Bacillus cereus* in bulk and packaged dried vegetables by culture and PCR.

Methods: This is a cross-sectional descriptive study from February 2019 to October 2020. In total 160 samples (80 from each of open and packed dried vegetables) were evaluated for the contamination of *Bacillus cereus*. 25 g of the sample was poured into 225 ml of peptone water and incubated at 37 ° C for 24 hours and then one ml of 0.1 dilutions of the suspension was inoculated into on the specific medium of Bacillus cereus (Scharlau, Spain). (MYP Agar) Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar. For the total count, 10 g of each dried vegetable was added into 90 ml of 0.1% peptone water and then 1 ml of dilutions (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}), were inoculated into MYP Agar medium and incubated at 37 ° C for 24 hours.

Large pink colonies (no fermentation of mannitol) with a precipitated halo (due to lecithinase production) were considered suspicious colonies. The identification was carried out by catalase and biochemical tests. anaerobic conditions, growth at 45 ° C, lestinase C test, hemolysis B in blood agar with 5% sheep blood, MR-VP test, penicillin sensitivity 10 IU test,and nitrate reduction(13). For molecular analysis, the polymerase chain reaction for the internal transcribed spacer (ITS) gene was used to confirm *Bacillus cereus*. In order to extract DNA from a pure colony of bacteria, it was cultured in an LB medium and after incubation, the resulting culture was precipitated and the genome was extracted using phenol-chloroform. The quality and quantity of DNA extracted were evaluated by spectrophotometry and electrophoresis. The extracted DNA was frozen at -20 ° C for later use (14). The PCR program consisted of an initial temperature of 94 ° C for 5 min, then 35 cycles consisting of 94 ° C for 30 s, 52 ° for 30 s, and 72 ° for 30 s. PCR reaction was performed in Thermal Cycler (Primus 96, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany). The standard strain of 11778 *Bacillus cereus* was used as a positive control. The PCR product was electrophoresed in 1% agarose gel at a voltage of 100-80 volts and after staining with ethidium bromide 1 mg/ml was observed and photographed by a gel dock device. Initially, the PCR gradient for the gene was placed in the annealing temperature range of 50 to 60 degrees, which was finally selected at an optimum temperature of 52 degrees (15). Using SPS software, data were analyzed by chi-square test. $p<0.05$ was considered significant.

Results: The *B. cereus* contamination were found in 21 (26.25%) and 13 (16.25%) of open and packed dried vegetable samples respectively. There was no statistically significant difference ($p>0.05$) between contamination rate of *B. cereus* in open and packed dried vegetable samples. Also, contamination rate of *B. cereus* was not significantly different ($p>0.05$) among various kinds of vegetable samples. The results of this study showed that 34 (21.25%) out of 160 samples of dried vegetables were infected with *Bacillus cereus* by the phenotypic method. PCR results of the ITS gene showed that all 34 strains isolated by culture were also identified by molecular method. In total 7 (4.37%) dill, 5 (3.12%) tarragon, 5 (3.12%) parsley, 5 (3.12%) mint, 6 (3.75%) soup, 4 (2.5%) coriander and 2 (1.25%) turmeric were identified as *Bacillus cereus* respectively.

Conclusion: Our study showed that despite the supply of packaged dried vegetables, there is still the possibility of microbial contamination, especially by anaerobic bacteria. Although the rate of contamination of dried vegetables in open packaged (13.2%) was more than dried packaged (12.8%).This percentage of contamination probably indicates a lack of hygiene in the drying process in both traditional and industrial forms.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Soltan Dallal MM, Nabatchian F, Sharifi-Yazdi S, Haghighat Khajavi S, pourmoradian M. Isolation and Identification *of Bacillus cereus* of Dry Bulk and Packaged Vegetables by Culture and PCR. Razi J Med Sci. 2022;29(9):31-40.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

مقدمه

ایمنی غذا و کنترل آن در دهه‌های اخیر به مسئله مهمی در بسیاری از کشورها تبدیل شده است. بیش از ۵۰ کشور از امضاکنندگان بیانیه پکن در مورد ایمنی غذایی موافقت خود را برای فراهم نمودن ایمنی و امنیت غذایی برای شهروندان خود، اعلام نموده‌اند (۲،۱). افزایش مصرف غذاهایی که در تماس بیشتر دست کارگران در فراوری های تجاری، خرده‌فروشی ها یا مؤسسات خدماتی مواد غذایی هستند، عامل مؤثری برای مواجهه بیشتر مصرف‌کنندگان با پاتوژن‌های غذایی است (۳). از جمله باکتری‌های مهم که توسط مواد غذایی به انسان منتقل می‌شوند می‌توان به *سالمونلا*، *کمپیلوباکتر*، *اشریشیاکلی*، *لیستریا منوسایتوژنز*، *شیگلا*، *ویبریو*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سرئوس* اشاره نمود (۴). در بررسی BLAKEY و همکاران نشان دادند که از ۳۹ نمونه غذایی خشک از ۱۲ نوع حبوبات و غلات مختلف،۲۲ نمونه (٪۵۶) به باسیلوس سرئوس آلوده بودند (۵). در مطالعه دیگری Ghourchian و همکاران با بررسی سبزی‌های خشک نشان دادند که ۳۱/۴٪ به باسیلوس سرئوس آلوده بودند(۶). متأسفانه مطالعات زیادی بر روی سبزی خشک و باکتری باسیلوس انجام نشده و بیشتر مطالعات در خصوص سبزیجات تازه است. آمارها نشان می‌دهند که مصرف سبزیجات تازه آماده مصرف در کشورهای مختلف یکسان نیست و از ۱ - ۱/۵کیلوگرم تا۳۰ کیلوگرم به ازای هر شخص در سال متفاوت است (اسپانیا ۱-۱/۵ کیلوگرم، انگلیس ۲ کیلوگرم، فرانسه ۶ کیلوگرم، ایتالیا ۴ کیلوگرم، آلمان و بلژیک ۳ کیلوگرم و امریکا ۳۰ کیلوگرم به ازای هر شخص در سال). در ایران هرچند آمار رسمی در دسترس نیست و به نظر می‌رسد که میانگین مصرف از مقدار فوق کمتر باشد، ولی آنچه مسلم است این است که با تغییر روش زندگی در کشور، این مقدار هر ساله افزایش می‌یابد، بطوریکه در چند سال اخیر کارگاه‌های تولید محصولات تازه بسته‌بندی شده چندین برابر شده است که نشانه تقاضای زیاد این نوع محصولات می باشد (۷). درعین حال طغیان بیماری‌های منتقله از غذا در نتیجه مصرف میوه‌ها و سبزیجات تازه افزایش یافته است. علت این افزایش ممکن است موارد زیر بوده باشد : تغییر مصرف فردی و عادات غذایی، روش های تولید و فراوری میوه ها و سبزیجات، منابع تولید، افزایش دامداری‌ها در نزدیکی محل‌های تولید محصول، دسترسی بیشتر به محصولات در سراسر جهان (که منشأ برخی از آن‌ها کشورهایی با شیوه‌های بهداشتی نامشخص است)، افزایش تعداد مصرف‌کنندگان دارای نقص سیستم ایمنی و ظهور پاتوژن هایی که قبلاً ارتباط آن‌ها با محصولات خام شناخته شده نبود. (۸).

باسیلوس سرئوس علاوه بر بیماری‌زا بودن، با داشتن فعالیت پروتئولیتیک و لیپولیتیک و آمیلولیتیک یکی از عوامل ایجاد فساد در مواد غذایی به شمار می‌رود. همچنین به دلیل توانایی رشد در ۶-۴ درجه سانتی‌گراد امکان فساد در یخچال را نیز فراهم می‌کند. معایبی نظیر بد طعمی، لخته شیرین و لخته تلخ هم در اثر فعالیت پروتئاز، لیپاز و فسفولیپازهای حاصل از باسیلوس سرئوس در فراورده‌های شیری مشاهده شده است (۹). بیماری‌های منتقله از غذا که توسط *باسیلوس سرئوس* ایجاد می‌شوند، یکی از نگرانی‌های عمده در جهان است. در تایوان در بازه زمانی ۲۰۰۳-۱۹۹۱، ۱۳۹ طغیان رخ داد؛ که در آن‌ها *باسیلوس سرئوس* بیش از *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ویبریو همولیتیکوس* نقش داشت. این باکتری در بسیاری از مواد غذایی مثل اسپاگتی، ماکارونی، برنج، لبنیات، محصولات شیر خشک، ادویه‌ها و ترشیجات، مواد غذایی خشک شده و همچنین گوشت، مرغ، سبزیجات، دانه‌ها و غذاهای دریایی ایجاد آلودگی می‌کند (۱۰-۱۲). با توجه به اینکه پژوهش‌های انجام شده در خصوص سبزیجات تازه نشان از آلودگی بالای سبزیجات به میکروارگانیسم‌های مختلف می‌باشد و سبزی‌های خشک از همین سبزی‌ها تهیه می‌شوند، لذا پیشنهاد بررسی سبزیجات خشک از نظر بار میکروبی و به‌ویژه باکتری های اسپوردار که قابلیت زیست طولانی در محیط‌های خشک را دارند، می‌باشد. لذا هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی *باسیلوس سرئوس* در سبزیجات خشک فله و بسته‌بندی به استفاده از روش کشت و PCR بوده است.

روش کار

در این مطالعه توصیفی تعداد ۱۶۰ عدد نمونه‌ی سبزی خشک فله (۸۰ نمونه) و بسته‌بندی (۸۰ نمونه)

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

از ۸ نوع سبزی برگ‌دار شامل شوید، تره، ترخون، جعفری، نعنا، گشنیز، قرمه سبزی و سبزی آش، از هر کدام ۱۰ نمونه تهیه شد. سپس به منظور جداسازی *باسیلوس سرئوس*، ابتدا ۵ گرم از نمونه را در ۴۵ میلی‌لیتر رینگر استریل ریخته و سپس سوسپانسیون تهیه شده را به خوبی مخلوط کرده و از آن روی محیط کشت اختصاصی باسیلوس سرئوس (MYP) برده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری شدند. کلنی‌های بزرگ صورتی (عدم تخمیر مانیتول) با هاله‌ی رسوب دار (به دلیل تولید لستیناز) کلنی‌های مشکوک محسوب می‌شوند (شکل ۱). سپس برای جداسازی باکتری‌های این گروه از تست‌های بیوشیمیایی شامل تست کاتالاز، رشد در شرایط بی‌هوازی، رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، تست تحرک، تست لستیناز c، همولیز B در Blood آگار با ۵٪ خون گوسفند، تست MR-VP، تست حرکت (SIM)، حساسیت به پنی‌سیلین 10IU و احیای نیترات برای جداسازی باکتری‌های *باسیلوس سرئوس* و *باسیلوس مایکوئیدس* و *با سیلوس تورنژنزیس* انجام گرفت (جدول ۱). تنها باسیلوس‌هایی که روی آگار خون‌دار با خون گوسفند همولیز بتا می‌دهند و نسبت به پنی‌سیلین ۱۰iu مقاومند، *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس تورنژنزیس* و *باسیلوس مایکوئیدس* می‌باشند. این آزمایش‌ها به منظور جداسازی باکتری *باسیلوس سرئوس* از

شکل ۱- کلنی‌های *باسیلوس سرئوس* بر روی محیط MYP آگار بعد از ۲۴ ساعت

جدول ۱- مقایسه آزمون‌های تاییدی باسیلوس سرئوس با برخی باسیلوس‌های دیگر

آزمون	باسیلوس سرئوس	باسیلوس آنتراسیس	باسیلوس مگاتریوم	باسیلوس میکوئیدیس	باسیلوس تورینجینسیس
رشد بی هوازی	+	+	-	+	+
تست کاتالاز	+	+	+	+	+
تحرک	+	-	+	-	+
تست ووژ پروسکوئر	+	+	+	+	+
احیای نیترات	+	+	V	+	+
Cلستیناز	+	-	-	+	+
همولیز بتا در آگار ۵٪ درخون گوسفند	+	+	-	-	+
حساسیت به پنی‌سیلین ۱۰ iu	-	+	V	-	-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

باسیلوس‌های دیگر می‌باشد (۱۳).

شمارش باسیلوس سرئوس: از سوسپانسیون با رقت ۰/۱ رقت‌های ۰/۰۰۱/۰۱، ۰/۰۰۰۱ با پیپت به اندازه یک میلی‌لیتر روی محیط اختصاصی *باسیلوس سرئوس* MYP (سرئوس سلکتیو آگار) کشت داده می شود. این محیط حاوی سو سپانسیون زرده تخم‌مرغ و نگهدارنده پلی میکسین B می باشد که هر یک و یال از این نگهدارنده به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط اضافه می‌شود. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌گردند. کلنی‌های بزرگ صورتی (عدم تخمیر مانیتول) با هاله‌ی رسوب دار (به دلیل تولید لستیناز) کلنی‌های مشکوک محسوب می‌شوند. برای شمارش *باسیلوس سرئوس* پلیت هایی با ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی در نظر گرفته می‌شوند. برای فرمول شمارش کلنی (cfu/g) = از تعداد کلنی× عکس رقت× عکس حجم به کار رفته از رقت استفاده گردید (۱۳). طبق جدول اداره کل آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو: (ویژگی های میکروبیولوژی، شماره FR- M 05 F12-008-07 پیوست: Wl-F12-005-04) نمونه‌هایی که تعداد کلنی‌ها بیش از 1.10^2 باشد به عنوان نمونه‌های غیر قابل مصرف در نظر گرفته شدند.

استخراج DNA: نمونه مناسب برای PCR کلنی تازه باکتری می‌باشد که بر روی محیط جامد بدون رنگ و یا محیط مایع کشت داده شده و ۱۸ تا ۲۴ ساعت بیشتر از انکوباسیون آن نگذشته باشد. سپس یک کلنی خالص از باکتری را در محیط LB کشت داده و پس از انکوباسیون، از کشت حاصله، رسوب تهیه کرده و با استفاده از فنول کلروفرم به استخراج ژنوم پرداخته شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفته شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- برای استفاده‌های بعدی فریز شد (۱۴).

روش انجام PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Polymerase Chain Reaction) یا PCR، تکنیکی است که با استفاده از آن می‌توان در مدت زمان کوتاهی قطعه خاصی از مولکول DNA را در شرایط آزمایشگاهی میلیون‌ها بار تکثیر نمود. این قطعه DNA ممکن است یک ژن، بخشی از یک کروموزوم یا بخش‌هایی از ژنوم یک موجود باشد.

مواد واکنش PCR: تکثیر توالی در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل آب مقطر و غلظت نهایی ۱/۵ میلی مولار MgCl2، بافر ۱x، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۰/۲۵ میلی مولار پرایمر Forward، ۰/۲۵ میلی مولار پرایمر Reverse، ۰/۵ یونیت آنزیم Taq پلیمراز و ۱۰ نانوگرم DNA انجام شد.

برنامه PCR: ژن Internal transcribed spacer (ITS) برای تایید *باسیلوس سرئوس* مورد استفاده قرار گرفت (۱۵). برنامه PCR شامل یک حرارت اولیه ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه سپس ۳۵ سیکل متشکل از حرارت ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه بود. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Thermal Cycler (Primus 96, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) انجام گرفت. از نمونه سوش استاندارد ۱۱۷۷۸ *باسیلوس سرئوس* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصول PCR در ژل آگارز یک درصد و در ولتاژ ۱۰۰-۸۰ ولت الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید ۱ mg/ml توسط دستگاه ژل داک مشاهده و عکس برداری گردید. در ابتدا PCR گرادیان برای ژن مورد نظر در بازه دمایی annealing ۵۰ تا ۶۰ درجه گذاشته شد که نهایتاً به دمای اپتیمم ۵۲ درجه رسیدیم (جدول ۲).

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون کای اسکوئر و نرم‌افزار SPSS

جدول ۲- پرایمرهای اختصاصی

قطعه هدف	توالی پرایمر (5′-3′)	اندازه (جفت باز)
ITS	5′- AAT TTG TAT GGG CCT ATA GCT CAG CT-3′ 5′- TTT AAA ATA GCT TTT TGG TGG AGC CT -3′	۱۸۵

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

ا ستفاده شده و موارد p< ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

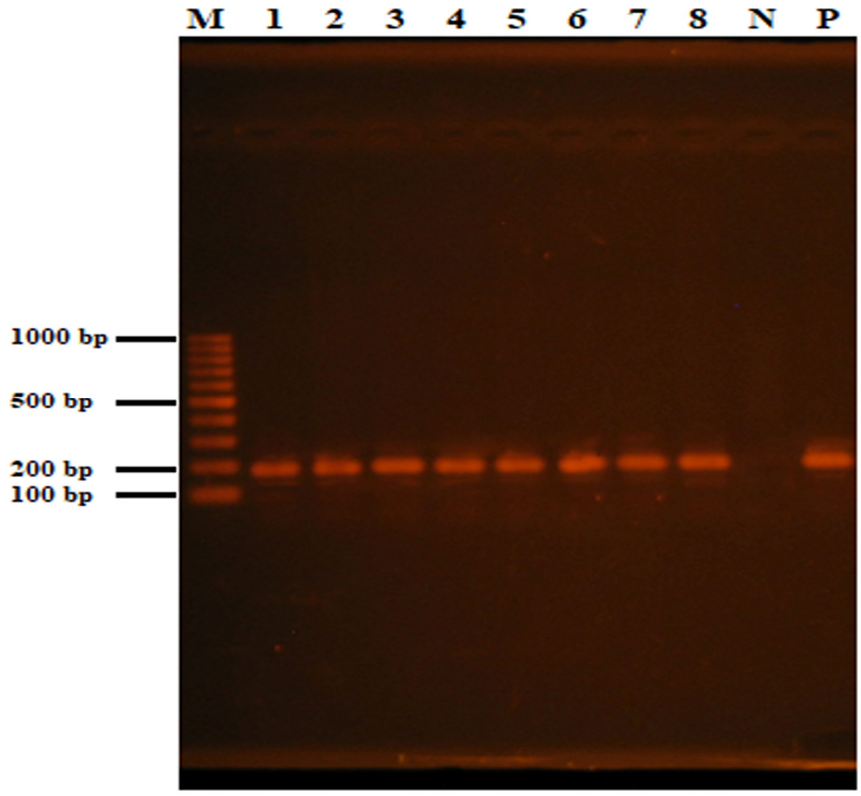
یافته‌ها

در این مطالعه از ۱۶۰ نمونه سبزی خشک، تعداد ۳۴ نمونه (۲۱/۲۵ درصد) آلوده به باسیلوس تشخیص داده شد. بر اساس واکنش‌های بیوشیمیایی تمامی جدایه‌های با سیلوس از نوع سرئوس بودند. بر روی همه نمونه‌های جدا سازی شده PCR انجام شد. نتایج PCR نشان داد تمامی جدایه های فنوتیپی با استفاده از ژنITS متعلق به گونه باسیلوس سرئوس بودند (شکل ۲). در مطالعه‌ی انجام شده، میزان آلودگی به باسیلوس در سبزیجات خشک فله ۲۱ مورد (۱۳/۱۲ درصد) و در سبزیجات خشک بسته‌بندی ۱۳ مورد (۸/۱۲ درصد) مشاهده گردید. میزان آلودگی به *باسیلوس سرئوس* در سبزیجات مختلف به شرح زیر ا ست: شوید ۷(۳۷٪)، ترخون ۵ (۳/۱۲ درصد)، جعفری ۴ (۲/۵ درصد)، نعنا ۳ (۱/۸۷ درصد)، آش ۶ (۳/۷۵ درصد)، تره ۲ (۱/۲۵ درصد)، گشنیز ۴ (۲/۵ در صد) و قرمه سبزی ۳ (۱/۸۷ در صد) مشاهده گردید.

بحث

م سمومیت غذایی در واقع نوعی گا ستروانتریت ا ست که التهاب روده و معده در عرض مدت کوتاهی بعد از مصرف غذای آلوده با تعداد زیادی فرم رویشی یا اسپور *با سیلوس سرئوس* ایجاد می شود. علی‌رغم نبود آب در سبزیجات خشک برخی از باکتری‌ها مخصوصاً باکتری های اسپور دار قادر به رشد و تکثیر دیگر محصولات غذایی خشک می‌باشند (۱۷،۱۶).

به دلیل زنده ماندن ا سپورها در حرارت ناکافی، ماندن غذا در دمای اتاق به مدت طولانی و ذخیره نادرست، خطر مسمومیت با این پاتوژن وجود دارد. به همین علت



شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR ژن ITS باسیلوس سرئوس با اندازه ۱۸۵ جفت باز.
ستون M: سایز مارکر. ستون P: کنترل مثبت (ATCC 11778). ستون N: کنترل منفی. ستون‌های ۱ تا ۸: نمونه‌های مثبت.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

این مواد غـذایی بـه عنوان منبع بـالقوه برای تولیـد توکسین و ایجاد طغیان‌های منتقله از مواد غذایی مطرح می‌باشند (۱۵،۱۲).

در مطالعه حاضـر که بر روی آلودگی سـبزی‌های خشک مصرفی به باکتری *باسیلوس سرئوس* صورت گرفت، میزان آلودگی به این باکتری ۲۱/۲۵٪ مشـاهده گردید.

آمارهای متفاوتی از بروز طغیان‌های مختلف توسـط این باکتری در جهان وجود دارد، اما در ایران متأسـفانه آماری در رابطه با مسـمومیت‌های غذایی توسـط این باکتری یافت نشد. این عامل می‌تواند ناشی از عدم ثبت اطلاعات کافی در مورد بیماران، عدم پیگیری بهبودی بیماران پس از مراجعه به مراکز درمانی و دوره‌ی کوتاه بروز علائم در این‌گونه مسمومیت‌ها باشد (۱۸).

با توجه به میزان پایین آب فعال سـبزی خشـک، این ماده غذایی می‌تواند بسـتر مناسـبی برای رشـد ارگانیسم‌های اسپوردار از جمله *باسیلوس سرئوس* باشد. ضمن این‌که سبزی خشک معمولاً در پایان پخت‌وپز و در مراحل انتهایی طبخ غذا به آن اضـافه می‌شـود خطر مسـمومیت *باسـیلوس سـرئوس* و سـایر ارگانیسـم‌های اسپوردار بالا می‌رود.

این باکتری از عوامل بیماری‌زایی اسـت که می‌تواند فرایند پاستوریزه شدن را تحمل کند و همچنین توانایی رشـد در دمای یخچال را نیز داراسـت. وجود اسـپور در این باکتری، وفور اسـپور های باکتری در محیط و مقاومت اسـپور به شـرایط خشـکی و دما و عوامل دیگر می‌تواند در ایجاد مسمومیت نقش داشته باشد (۱۹).

تا به امروز تکنیک‌های شناسایی و تشخیصی مختلفی جهت شناسایی *باسیلوس سرئوس* توسعه یافته است. روش‌های کشـت و شـناسـایی نهایی توسـط تسـت‌های بیوشـیمیایی به حداقل هفت روز نیاز دارند. از تکنیک‌های مولکولی مورد استفاده جهت شناسایی این باکتری می‌توان انجام PCR را نام برد (۱۵).

در این مطالعه که بر روی آلودگی سبزی خشک باز و بسته‌بندی به *باسیلوس سرئوس* به دو روش فنوتیپی و ژنوتیپی انجام شد، علی‌رغم طولانی بودن روش فنوتیپی، روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای PCR نیز یافته های فنوتیپی را تایید نمود. با توجه به مورفولوژی خاص *باسیلوس سرئوس* بر روی محیط MYP Agar شناسایی این باکتری را به سادگی انجام پذیر است. معهذا سرعت عمل روش مولکولی در شـناسـایی *باسـیلوس* به مراتب سریع‌تر از روش‌های سنتی است و این می‌تواند مزیت بزرگ استفاده از روش مولکولی باشد.

Logan در سـال ۲۰۱۲ *باسـیلوس میکوئیدس*، *باسیلوس مگاتریوم* و *باسیلوس لیکنی فرمیس* را نیز از عوامل تولیدکننده‌ی توکسین های اسهالی و استفراغی در بیماری‌های منتقله از غذا معرفی کرد و خواسـتار توجه بیشـتر روی این باکتری‌ها شـد. Logan توانایی تولید توکسین های مشابه توسط این باکتری‌ها را نیز تایید کرد (۱۶).

Reyers و همکارانش نیز در سـال ۲۰۰۷ با بررسـی ۳۸۱ نمونه از انواع غذای کودکان مصـرفی در برنامه تغذیه‌ای مدارس شیلی، میزان شیوع *باسیلوس سرئوس* در غذاهای کودکان بر پایه برنج و شـیر ۶۲/۵ درصـد اعلام نمود که ۲۹/۸ درصـد آن‌ها انتروتوکسـین nhe تولید کرده بودند (۱۷).

مطالعات Abakari و همکاران در سـال ۲۰۱۸ در غنا نشـان دادند سـالادهایی که توسـط فروشـندگان مواد غذایی خیابانی در مرکز دادوسـتد تاماله (غنا) فروخته می شوند برای مصرف انسان نامناسب هستند در این بررسی آن‌ها موفق به جداسازی اشریشیا کلی، باسیلوس سرئوس، شیگلا و سالمونلا به ترتیب با ۹۶/۷٪، ۹۳/۳٪، ۷۶/۷٪ و ۷۳/۳٪ در سـالاد سـبزیجات آماده مصـرف شـدند. این آلودگی می‌تواند ناشـی از منبع تولید سبزیجات و استفاده نامناسب از مواد غذایی باشد (۲۰).

همچنین در پژوهش ما، تعداد نمونه‌های *باسـیلوس سرئوس* جدا شده از سبزی خشک بسته‌بندی ۱۳ مورد (۸/۵ درصـد) کمتر از سـبزیجات خشـک فله ۲۱ مورد (۱۳/۱ درصـد) بود که این امر نشـان‌دهنده‌ی اهمیت باکتری‌های اسپور دار هوازی در فرایند خشک کردن و نگهداری طولانی در فضـای آزاد می‌باشـد. جدایه های *باسیلوس سرئوس* جدا شده از نمونه‌های سبزی خشک در این مطالعه از نظر وجود ژن its مورد بررسـی قرار گرفتند. همه این جدایه‌ها از نظر وجود ژن its مثبت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

بودند.

در مطالعه‌ی Gdoura-Ben Amor و همکاران در سال ۲۰۱۸ در تونس روی ۶۸۷ نمونه از مواد غذایی مختلف مانند غلات، ادویه، غذای پخته، سبزیجات تازه، گوشت مرغ خام و پخته، غذاهای دریایی، کنسرو، شیرینی و لبنیات آزمایش انجام گرفت و ۱۹۱(۲۷/۸ درصد) *باسیلوس سرئوس* جداسازی گشت که این میزان به مطالعه‌ی ما شباهت زیادی با میزان آلودگی به باسیلوس (۲۱/۲۵ درصد) بود، مشاهده می‌شود(۲۱).

Kudjawu و همکاران نیز در سال ۲۰۱۱ روی ۷۵ نمونه سبزی خشک آنالیز انجام داده و باکتری‌های باسیلوس سرئوس، *استافیلوکوکوس اورئوس، میکروکوکوس و سودوموناس* و انواعی از قارچ ها را جداسازی کردند (۲۲).

Postollec و همکارانش نیز با بررسی ۹۰ ماده غذایی از جمله سبزیجات خشک، توانستند انواعی از انواع *کلستریدیوم و باسیلوس* را با روش مولکولی شناسایی کنند. یافته‌های این محققین نشان داد که ۳۰ تا ۴۰ درصد محصولات به *باسیلوس و کلستریدیوم* آلوده بودند (۲۳).

نتیجه‌گیری

مطالعه ما نشان داد علیرغم ارائه سبزی خشک به صورت بسته‌بندی، باز امکان آلودگی میکروبی به‌ویژه از جانب باکتری‌های بی‌هوازی وجود دارد. اگرچه میزان آلودگی سبزی‌های خشک به صورت باز (۱۳/۲ در صد) بیشتر از سبزی‌های خشک به‌صورت بسته‌بندی (۸/۱۲ در صد) می‌باشد. این در صد آلودگی احتمالا بیانگر عدم رعایت اصول بهداشتی در پروسه خشک کردن به هردو صورت سنتی و صنعتی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه بخشی از گرنت تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ۴۵۸۹۷ و دارای کد اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1398. 857 می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی بودند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

References

1. Petroczi A, Taylor G, Nepusz T, Naughton DP. Gate keepers of EU food safety: Four states lead on notification patterns and effectiveness. Food Chem Toxicol. 2010;48(7):1957-1964.
2. Schlundt J. New directions in foodborne disease prevention. Int J Food Microbiol. 2002;78(1):3-17.
3. Lianou A. Sofos JN. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. J Food Protect. 2007;70(9):2172-2198.
4. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H et al. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol. 2010;139 Supple 1:S3-15.
5. Blakey LJ, PRIEST FG. TheOccurrenceof Bacilluscereusin some Dried Foods Including Pulsesand Cereals. J Appl Bactriol. 1980;48:291 -302.
6. Ghourchian S, Douraghi M, Baghani A, Soltan Dallal MM. *Bacillus cereus* assessment in dried vegetables distributed in Tehran, Iran. J Food Quality Hazards Control. 2018;5:29-32.
7. Olaimat AA, Holley RA. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. Food Microbiol. 2012 Oct;32(1):1-19.
8. Bahreini M, Habibi Najafi MB, Basami M R, Abbaszadegan M, Bahrami AR, Ejtehadi HR. Microbial load evaluation of fresh-cut vegetables during processing steps in a vegetable processing plant using minimally processing approach. Iran Food Sci Tech Res J. 2011;7(3):235-242.
9. Deilami Khiabani Z, Noori E, Rahnama M, Shapouri R, Bigdelo Y, Ghamari D, et al. Detection of NHE Complex Genes in *Bacillus cereus* Isolated from Rice Samples from Zanjan, Iran by Multiplex PCR. Modares J Medl Sci: Pathobiology. 2012;14(4):89-97.
10. Finlay WJJ, Logan NA, Sutherland AD. *Bacillus cereus* emetic toxin production in cooked rice. Food Microbiol. 2002;19:431-439.
11. Rahmati T R, Labbe T. Levels and Toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from Retail Seafood, J Food Protect. 2008;71(6):1178–1185.
12. Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, Devlieghere F. Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]

isolated from food products marketed in Belgium. Int J Food Microbiol. 2011;150(1):34–41.

13. National Standard of Iran. Counting and identification of *Bacillus cereus* in food. Second revision, Fifth Edition, 2006:2324.

14. Ombui JN, Gitahi JN, Gicheru M. Direct detection of *Bacillus cereus* enterotoxin genes in food by multiplex polymerase chain reaction. Inter J Integ Biol. 2008;2(3):172-181.

15. Soltan Dallal MM, Nezamabadi S, Mardaneh J,Rajabi Z, Sirdani A. Detection of toxigenic *bacillus cereus* strains in powdered infant formula (PIF) milk by PCR assay. Tehran Univ Med J. 2017;75(3):179-186.

16. Logan N. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. J Appl Microbiol. 2012;112(3):417-29.

17. Reyes JE, Bastías JM, Gutiérrez MR, Rodríguez MdlO. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by chilean School feeding program. Food Microbiol. 2007;24(1):1-6.

18. Soltan Dallal MM, Motalebi S, Masoumi Asl H, Rahimi Forushani A,Sharifi Yazdi MK, Rajabi Z et al. Analysis of epidemiological data of foodborne outbreak reported in Iran. Tehran Univ Med J. 2015;72(11):780-788.

19. Moulaei Kohne Shahri S,Hosseinzadegan H,Taghinejad J. A review of the virulence structure of *Bacillus cereus.* J Lab Diag. 2015,29:51-67.

20. Abakari G, Jerry Cobbina S, Yeleliere E. Microbial quality of ready-to-eat vegetable salads vended in the central business district of Tamale, Ghana. Inter J Food Contaminat. 2018;5(1):1-9.

21. Gdoura-Ben Amr M, Siala M, Zayani M, Grosset N, Smaoui S, Messadi-Akrout F et al. Isolation, Identification, Prevalence, and Genetic Diversity of *Bacillus cereus* Group Bacteria From Different Foodstuffs in Tunisia. Front Microbiol. 2018 Mar 12;9:447.

22. Kudjawu BD, Sakyi-Dawson E, Amoa-Awua WK. The microbiota of dried traditional vegetables produced in the Sudan Savannah and Guinea Savannah agro-ecological zones of Ghana. Inter Food Res J. 2011 Feb 1;18(1).101-108.

23. Postollec F, Mathot AG, Bernard M, Divanac'h ML, Pavan S, Sohier D. Tracking spore-forming bacteria in food: from natural biodiversity to selection by processes. Inter J Food Microbiol. 2012 Aug 1;158(1):1-8.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-08-10]