فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ۵، شمارهٔ ٤، زمستان ۱۳۹۵، صفحه ۲۹- ٤۱

مطالعه امکان ورود باکتری *Listeria monocytogenes* به حالت زنده اما غیرقابل کشت در آب نمک، در فرایند تولید ماهی شور

مهدی ذوالفقاری[۱]، مسعودرضائی[۲*]، مهدی فروزنده مقدم[۳]، اشرف محبتی مبارز[٤]، هدایت حسینی[۵]

۱- دانشجوی دکتری،گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
۲- استاد، گرو ه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
٤- دانشیار، گروه باکتریشناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۵- استاد، گروه صنایع غذایی، دانشکده وانستیتوتغذیه وصنایع غذایی، دانشگاه شهیدبهشتی، تهران

دریافت: ۹٤/۰۹/۱۸ پذیرش: ۹٤/۱۲/۱۱

*نویسنده مسئول مقاله: rezai_ma@modares.ac.ir

چکیده:

باکتری *L. monocytogenes* از جمله پاتوژن‌های با منشأ مواد غذایی است که مقاومت بالایی در برابر شرایط نامساعد محیطی دارد. این پاتوژن می‌تواند در شرایط نامطلوب محیطی وارد حالت «زنده اما غیرقابل کشت» (VBNC) شود. مطالعه حاضر با هدف بررسی امکان ورود این پاتوژن به حالت VBNC در شرایط شوری بالای آب نمک که در فرایند تولید ماهی شور استفاده می‌شود، انجام شد. بدین منظور امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* ATCC 19115 با غلظت اولیه $۱/۱۲\times۱۰^{۷}$ در سه تیمار آب نمک ۳۰ درصد (ES30)، آب نمک ۱۰ درصد (ES10) و شرایط گرسنگی کامل باکتری (DE) طی دوره زمانی ۸ روز،به حالت VBNC بررسی شد. برای اثبات زنده بودن باکتری از روش بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتریبا روش RT-PCR استفاده گردید. نتایج به‌دست آمده نشان داد که باکتری بررسی شده در تیمار ES30 و DE در روز سوم پس از تلقیح قابلیت کشت خود را از دست داده و وارد حالت VBNC شدند. طبق این نتایج ورود به حالت VBNC در تیمار ES10 در روز پنجم پس از تلقیح اتفاق افتاد. این نتایج نشان می‌دهد که امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* طی فرایند تولید ماهی شور و ماهی دودی و یا هر فراورده غذایی شور شده دیگر، به حالت VBNC و عدم توانایی تشخیص با استفاده از روش‌های استاندارد موجود، وجود دارد.

کلید واژگان: نمک، زنده اما غیرقابل کشت (VBNC)، *Listeria monocytogenes*، ماهی شور

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

مقدمه

پاتوژن فرصت طلب *Listeria monocytogenes* عامل بیماری لیستریوزیز، یک عفونت جدی با میزان بستری شدن و نرخ مرگ و میر بالا است که به‌طور عمده با مصرف مواد غذایی آلوده به انسان منتقل می‌شود (Baars, 2012). افزایش استفاده از غذاهای آماده مصرف[1] (RTE) باکتری *L. monocytogenes* را به خطری جدی تبدیل کرده است. زیرا این پاتوژن می‌تواند محدودهٔ وسیعی از شرایط تنش‌زای محیطی، نظیر دمای پایین، pH اسیدی و اسملاریته بالا را تحمل کند.طبق گزارش مرکز کنترل و جلوگیری از بیماری‌های اروپا (EFSA-ECDC[2]) در سال ۲۰۰٦، لیستریوزیز پنجمین عفونت زونوتیک شایع در اروپا بوده که حدود ۲۸ درصد مرگ و میر ناشی از پاتوژن‌های بیماری‌های غذازاد در انگلیس ناشی از این باکتری است (EFSA, 2015). این سازمان در ژانویه سال ۲۰۱۵ اعلام کرد که لیستریوزیز بین سال‌های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۳ حدود ۸/٦ درصد افزایش یافته که این افزایش طی ۵ سال گذشته ادامه داشته است. طبق این گزارش،با وجود افزایش لیستریوزیز در انسان، عامل این بیماری، یعنی *L. monocytogenes*، به‌ندرت بیش از حد استاندارد سلامت غذایی در غذاهای آماده مصرف تشخیص داده شده است (Prevention and epidemiological report, 2014).طبق گزارش EFSA این پاتوژن اگرچه غیرشایع است، اما عفونت شدید و خطرناکی می‌دهد که در زنان باردار و افراد بالای ٦۵ سال بسیار مهم و کشنده است (Jakobsson, 2014). با توجه به اینکه از عمده راه‌های ورود این پاتوژن به بدن انسان غذاهای آلوده به آن است، کنترل کیفیت محصولات غذایی از نظر حضور این پاتوژن اهمیت بالایی دارد. نکته مهمی که در این میان توجه بسیاری از صاحب‌نظران را به خود جلب کرده این است که به‌تازگی مباحثی پیرامون تحمل بالای این پاتوژن در برابر تنش‌های محیطی و سازگاری جالب توجه این باکتری مطرح شده است. تحقیقات نشان می‌دهد که این پاتوژن در صورت قرارگیری در معرض برخی عوامل نامساعد محیطی می‌تواند وارد یک حالت فیزیولوژیکی خاص شود که در این حالت باکتری قابلیت کشت خود را از دست داده ولی همچنان زنده باقی می‌ماند که در اصطلاح به این حالت باکتری‌ها «Viable but non culturable یا زنده اما غیرقابل کشت (VBNC)» گویند(Li et al., 2014). این مسئله زمانی اهمیت پیدا می‌کند که بدانیم روش‌های استاندارد و متداول موجود برای کنترل کیفیت این باکتری و سایر باکتری‌ها بر مبنای قابلیت کشت، تکثیر و تشکیل کلونی آنها در محیط‌های کشت استاندارد شده بنا شده است. بنابراین باکتری در حالت VBNC طی فرایندهای کنترل کیفیت قابل تشخیص نخواهد بود(Oliver, 2010). نکته جالب توجه این است که بسیاری از فرایندها و شرایطی که انسان به‌منظور افزایش ماندگاری مواد غذایی یا از فراوری محصولات نظیر تغییر pH، کاهش فعالیت آبی، کاهش یا افزایش دما، شور کردن و غیره استفاده می‌کند،ممکن است باکتری را برای ورود به حالت VBNC مجبور کند(Pinto et al., 2011).

برخی گزارش‌ها از حفظ قدرت پاتوژنی در این قبیل سلول‌ها حکایت دارد. به‌طوری‌که گزارش شده است طی فرایند پاستوریزاسیون باکتری ممکن است قدرت رشد و تشکیل کلونی را از دست بدهد، اما فرایندهای رونویسی و

۱. Ready to eat

۲. European Food Safety Authority- European Control Diseases Center

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

ترجمه در آن صورت می‌گیرد (Oliver, 2010). علاوه بر این عنوان شده است که این سلول‌ها ممکن است خود پاتوژن محسوب نشوند، اما پس از مساعد شدن شرایط و احیا و رسیدن به حالت متابولیسم فعال می‌توانند ویژگی‌های پاتوژنی خود را بروز دهند (Li et al., 2014).

این مسئله زمانی اهمیت دارد که این باکتری‌ها با تغییر شرایط بتوانند احیا شوند و به حالت فعال در بیایند. Coutard و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که انواع مختلفی از ویبریوها بیماری‌زایی خود را در حالت VBNC حفظ می‌کنند و می‌توانند باعث مرگ و میر و همچنین احیا در موش شوند.

یکی از عوامل مهم در فراوری مواد غذایی، به‌ویژه محصولات دریایی از دیرباز، استفاده از نمک بوده است. محصولات شور شده[۳] یا نمک سود شده[٤] به‌عنوان محصولات نیمه آماده تولید و مصرف می‌شوند.

این روش‌ها تنها به‌منظور افزایش ماندگاری استفاده نمی‌شوند، بلکه ایجاد طعم مخصوص در این فراورده‌ها نیز مدنظر تولیدکنندگان است. امروزه استفاده از شور کردن ماهی برای تولید فراورده سنتی ماهی دودی هنوز هم کاربرد فراوانی دارد. مرحله اول تولید ماهی شور غوطه‌ور کردن آن در آب نمک اشباع (حدود ۳۰ درصد) است (Valipour et al., 2011; Alipour et al., 2009). ماهی یا فراوردهٔ شور شده ممکن است مستقیم وارد بازار مصرف شود یا برای دودی کردن استفاده گردد.

Cappelier و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که باکتری *L. monocytogenes* در شرایط گرسنگی در دمای پایین می‌تواند وارد حالت VBNC گردد. شوک اسمتیک امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC را افزایش می‌دهد (Cunningham et al., 2009)، اما اینکه این امکان در شوری‌های بالا نیز وجود دارد یا خیر بررسی نشده است.

تحقیقات زیادی حضور باکتری *L. monocytogenes* را در محصولات نمک سود شده گزارش کرده‌اند. گزارش‌هایی دربارهٔ حضور این باکتری در ماهی کفال نمک سود شده و فیتوفاگ دودی و تازه (Basti et al., 2006) ارائه شده است. پژوهش‌ها حضور بالای باکتری *L. monocytogenes* را در ماهی سالمون دودی و ماهی نمک سود شده را نیز گزارش کرده‌اند (Di Ciccio et al., 2012). این حضور باکتری در فراورده‌های ماهی و همچنین قدرت ورود باکتری لیستریا به حالت VBNC، لزوم پرداختن به مسئله امکان ورود این باکتری به حالت VBNC را بیش از پیش مشخص می‌کند.

با توجه به موضوعات مذکور، هدف این پژوهش بررسی امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC طی حضور در آب نمک و در معرض غلظت بالای نمک است.

مواد و روش‌ها

سویه مورد مطالعه و کشت آن

باکتری *L. monocytogenes* سویه استاندارد ATCC 19115 (سروتایپ 4b)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سپس باکتری‌ها در محیط BHI براث به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ ºC گرمخانه‌گذاری شدند. سپس روی محیط BHI آگار کشت شدند و ۲٤ ساعت در ۳۷ ºC گرمخانه‌گذاری شدند. بعد یک کلنی خالص شده وارد محیط BHI براث شده و پس

۳. Brine
٤. Salted

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در انکوباتور شیکردار در ºC ۳۷ با rpm ۲۰۰ در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به نسبت ۱۰۰ میکرولیتر باکتری، به همراه ۱۵ درصد گلیسرول در ºC ۷۰- نگهداری شدند.

آزمون‌های تأییدی باکتری

در این تحقیق با وجود اینکه سویه مورد مطالعه، به‌عنوان سویه استاندارد از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید، آزمون‌های متداول و معتبر برایتأیید این باکتری انجام شد.به منظور تأیید باکتری تهیه شده آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، بررسی همولیزکنندگی روی آگار خون‌دار و بررسی حضور ژن *16S rRNA*اختصاصی این باکتری با آزمون PCR صورت پذیرفت.

آماده‌سازی باکتری‌ها برای تلقیح به محیط‌های کشت

به‌منظور تلقیح محیط های مورد بررسی، ابتدا باکتری‌ها از ذخیره ºC ۷۰- وارد محیط BHI براث شده و پس از یک شب انکوباسیون در ºC ۳۷ در انکوباتور شیکردار با شدت rpm ۲۰۰، روی محیط BHI آگار کشت داده شدند. پلیت‌های کشت داده شده به‌مدت ٢٤ ساعت در ºC ۳۷ انکوباسیون شدند. سپس یک کلونی خالص به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براث استریل منتقل شد و در انکوباتور شیکردار با rpm ۲۰۰ در ºC ۳۷ انکوباسیون شروع گردید. رشد باکتری‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتورمتر در nm OD_{600} کنترل گردید و باکتری‌ها در جذب حدود ۰/٤ که معادل تقریباً ۵×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر است،برای تلقیح استفاده شدند. در این میزان جذب باکتری‌ها تقریباً در اوایل تا اواسط مرحله رشد لگاریتمی می‌باشند (Sue et al., 2003). همزمان با بررسی میزان جذب با اسپکتروفتومتر، کشت باکتریایی نیز روی محیط BHI آگار صورت گرفت و پلیت‌ها پس از ٤٨ ساعت انکوباسیون شمارش شدند. جذب ۰/٤ در حدود ٦ ساعت پس از تلقیح به‌دست آمد.

آماده‌سازی محیط‌های مورد بررسی

به‌منظور بررسی رفتار باکتری در محیط‌های Invitro از محیط های آب مقطر طبق پروتکل‌های استاندارد استفاده گردید(Besnard et al., 2002). بدین منظور آب مقطر دیونیزه ابتدا اتوکلاو شد و سپس سه تیمار مورد نظر ایجاد گردید. برای ایجاد تیمار شرایط گرسنگی از آب مقطر با pH حدود ٦ استفاده شد. عکس‌العمل باکتری به شرایط مورد نظر در ۳ تیمار آب نمک۳۰ درصد (معادل شور کردن سنگین ماهی) (ES30)، آب نمک ۱۰ درصد (معادل شور کردن سبک) (ES10) و آب مقطر (DE) (پروتکل استاندارد) در دمای محیط بررسی شد.

تلقیح باکتری به محیط‌های مورد بررسی

باکتری‌ها پس از سانتریفیوژ در دمای اتاق به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت rpm ۷۰۰۰ و شست‌وشو با سرم فیزیولوژی با غلظت $۱/۱۲\times۱۰^{۷}$ به محیط‌های آماده شده تلقیح شدند. نمونه‌برداری از تیمارها در زمان صفر (پس از تلقیح) روز ۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷ و۸انجام شد. بدین منظور ۱۰۰µl از هر نمونه به‌منظور بررسی کشت باکتریایی،۱ میلی‌لیتر برای بررسی امکان کشت‌پذیری مجدد در محیط کشت BHI براث و ۱ میلی‌لیتر به‌منظور استخراج RNAبرای بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد.

کشت‌پذیری

در انتهای فرایند حرارت‌دهی نمونه‌ها به‌منظور بررسی حضور باکتری‌های کشت‌پذیر روی محیط BHI آگار غنی‌شده با ۰/٦ درصد عصاره مخمر و ۰/۱ درصد سدیم

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

پیروات، به‌منظور احیای احتمالی باکتری‌های زنده صدمه دیده و محیط اختصاصی لیستریا کروموژنیک آگار کشت داده شدند. برای تعیین زنده بودن باکتری‌ها از بررسی کیفی بیان ژن *16S rRNA* استفاده گردید.

بررسی حضور باکتری زنده با استفاده از روش RT-PCR ژن *16S rRNA*

برای بررسی حضور باکتری زنده در تیمارهای مورد بررسی، زمانی‌که در نمونه دیگر باکتری قابل کشت روی محیط BHI آگار مشاهده نشد، از روش بررسی بیان ژن به‌عنوان دقیق‌ترین شاخص شناخته شده برای بررسی زنده بودن باکتری‌ها نیز استفاده گردید(Oliver, 2010). بدین منظور از RT-PCR ژن *16S rRNA* استفاده شد. برای این هدف ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نمونه گوشت همگن شده در دور ۷۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و در ادامه پلت حاصل که حاوی باکتری نیز بود، مورد لیز سلولی و استخراج RNA قرار گرفت و فرایندRT-PCR و الکتروفورز طبق روش‌های مشروح در بخش‌های مربوط صورت پذیرفت.

استخراج RNA باکتری

بدین منظور از کیت توپازول(شرکت توپازژن کاوش، ایران) استفاده گردید که مراحل آن به‌طور خلاصه به شرح زیر است. پس از سانتریفیوژ باکتری و خروج محیط کشت آن، ۱۰۰ µl آنزیم لیزوزیم با غلظت ۲۰ mg/ml و ۱۰ µl آنزیم پروتئیناز K با غلظت mg/ml ۱۰ (SinaClon, Iran) به باکتری‌ها اضافه و با سمپلر همگن شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ ºC به‌منظور لیز اولیه باکتری‌ها انکوباسیون شدند. بعد ۱ میلی‌لیتر محلول توپازول به نمونه اضافه و ۵ دقیقه در دمای اتاق برای تفکیک کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی انکوباسیون شد. سپس ۲۰۰ µl کلروفرم سرد به آن اضافه و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون شد و بعد در ۱۲۰۰۰ دور در دمای ºC ۸-۲ سانتریفیوژ گردید. سپس لایه شفاف رویی به تیوب جدید منتقل و ۵۰۰ µl ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. پس از چند بار سر و ته کردن تیوب و ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، در ۱۲۰۰۰ دور و دمای ۸-۲ درجه سلسیوس سانتریفیوژ انجام شد. مایع رویی خارج و ۱ میلی‌لیتر الکل اتانول ۷۰ درصد سرد (با آب DEPC) ساخته شده به پلت RNA اضافه شد و در ۷۵۰۰ g به‌مدت ۵ دقیقه در ۸-۲ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. مایع رویی خارج و پلت RNA در زیر هود در دمای اتاق خشک شد. ۱۰۰ µl آب DEPC ۵۵ درجه به پلت RNA اضافه و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۵۵ درجه RNA حاصل تا زمان استفاده در ºC ۷۰- نگهداری گردید.

برای حذف DNA ناشی از آلودگی با استفاده از کیت DNase I(شرکت سیناکلون، ایران) به شرح زیر استفاده گردید.

۱- به‌ازای هر ۱ µg RNA مقدار ۱ µl بافر MgCl2 (10X) و ۰/۵ µl آنزیم DNase افزوده و با استفاده از DEPC حجم نهایی را به ۱۰ µl رسانده شد؛ ۲- مخلوط را در ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون گردید؛ ۳- مقدار ۱ µl EDTA با غلظت ۵۰ mM به میکروتیوب افزوده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ºC ۶۵ به‌منظور توقف واکنش انکوباسیون شد. RNA حاصل در RT PCR و سنتز cDNA استفاده گردید.

سنتز cDNA

برای انجام RT-PCR ابتدا نیاز است cDNA از روی mRNA موجود در نمونه RNA استخراجی سنتز گردد. به‌منظور سنتز cDNA از کیت Mastermix RT

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

PCR(شرکت کیاژن طب صدرا، ایران) استفاده شد. بدین منظور µl ۱ رندوم هگزامر به µl ۱۰ از RNA تیمار شده با DNase I اضافه شد و ۵ دقیقه در °C ۷۰ انکوباسیون گردید. سپس نمونه روی یخ سرد شده و µl ۱۰ از محلول آماده کیت سنتز cDNA به آن اضافه شد. این نمونه به‌مدت ٦۰ دقیقه در °C ۳۷ انکوباسیون گردید. در نهایت نمونه حاوی cDNA سنتز شده می‌باشد.

cDNA سنتز شده به‌منظور انجام فرایندPCR استفاده شد.

فرایندPCR

برای انجام عملیات PCR از کیت Prim Taq Premix (2X)(شرکت کیاژن طب صدرا) استفاده شد.

برای تهیه مستر میکس به‌منظور انجام عملیات PCR به‌صورت زیر اجزای واکنش اضافه گردید:

پرمیکس پرایم تک به مقدار µl ۱۰، DNA الگو µl ۳، مخلوط پرایمر فوروارد و ریورس به مقدار µl ۱ (هر کدام با غلظت ۵ پیکو مولار) و حجم نهایی با استفاده از آب دیونیزه استریل به µl ۲۰ رسید. مخلوط به‌مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ جزئی شد تا قطراتی که روی جداره میکروتیوپ بود، حذف شود. سپس این میکروتیوپ در دستگاه PCR قرار گرفت و تنظیمات دستگاه به‌صورت زیر انجام شد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش به‌صورت زیر بود (Tan et al., 2012).

F:TTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGG
R:GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG

مرحله ۱: واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سلسیوس. مرحله ۲: تکثیر DNA به تعداد ۳۵ چرخه: الف) واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه سلسیوس ب) اتصال پرایمر: ۳۰ ثانیه در ٦۰–۵۰ درجه سلسیوس ج) گسترش: ۳۰ تا ٦۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس. مرحله ۳: باز سرشت نهایی: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس.

الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز انجام شد و سپس به‌وسیلهٔ دستگاه ژل داک عکس‌برداری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت پذیرفت. تمام آزمایش ۲ نوبت تکرار و هر نوبت با ۳ تکرار انجام شد. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل صورت پذیرفت.

نتایج

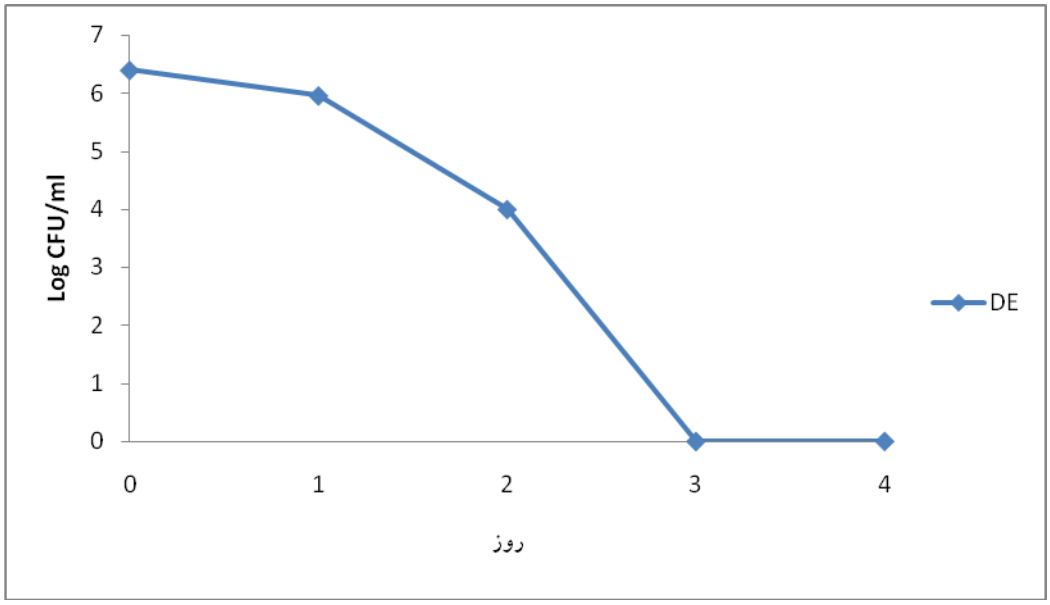
آزمون‌های همولیزکنندگی قدرت همولیز کردن باکتری روی آگار خوندار را نشان داد. رنگ‌آمیزی گرم، شکل باسیل گرم مثبت باکتری را نشان می‌دهد. نتایج PCR ژن *16S rRNA* که ژن اختصاصی است، این باکتری را تأیید کرد.

بررسی کشت‌پذیری باکتری‌ها در محیط BHI آگار و محیط اختصاصی لیستریا در تیمار گرسنگی در دمای محیط

نتایج بررسی کشت‌پذیری باکتری بررسی شده در تیمار گرسنگی در دمای محیط در شکل ۱ نشان داده شده است. طبق این نتایج، باکتری *L. monocytogenes* 19115 در روز ۳ پس از تلقیح،کشت‌پذیری خود را ازدست داد. در این روز باکتری لیستریا در محیط اختصاصی کروموژنیک و محیط BHI غنی‌شده با سدیم پیرووات تشکیل کلنی نداد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

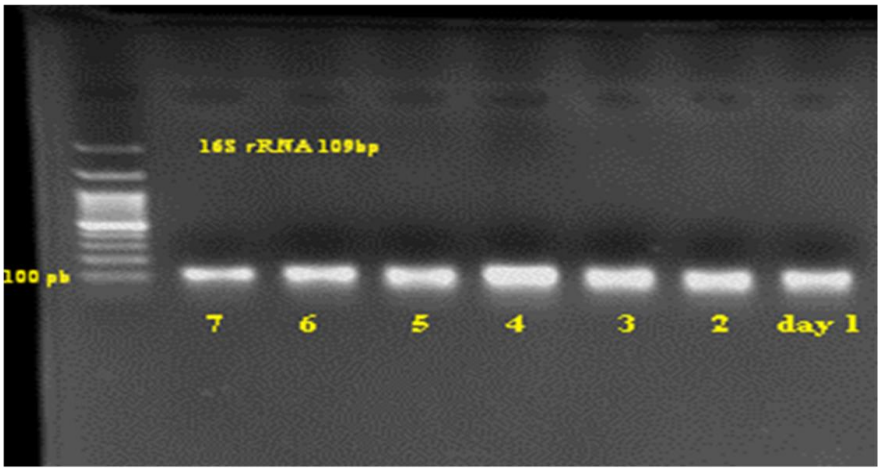


شکل ۱ بررسی قابلیت کشت باکتری *L. monocytogenes* در محیط کشت اختصاصی کروموژنیک و محیط BHI آگار غنی‌شده در تیمار DE

بررسی زنده بودن باکتری لیستریا در تیمار گرسنگی در دمای محیط با استفاده از روش RT-PCR*16S rRNA*

نتایج بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتری لیستریا در تیمار گرسنگی در دمای محیط در شکل ۲ نشان داده شده است.

طبق این نتایج، این باکتری پس از عدم کشت‌پذیری بیان ژن *16S rRNA* خود را ادامه داد که نشان از زنده بودن باکتری داشت.



شکل ۲ نتایج الکتروفورز RT PCR ژن *16S rRNA* باکتری لیستریا در تیمار گرسنگی در دمای محیط

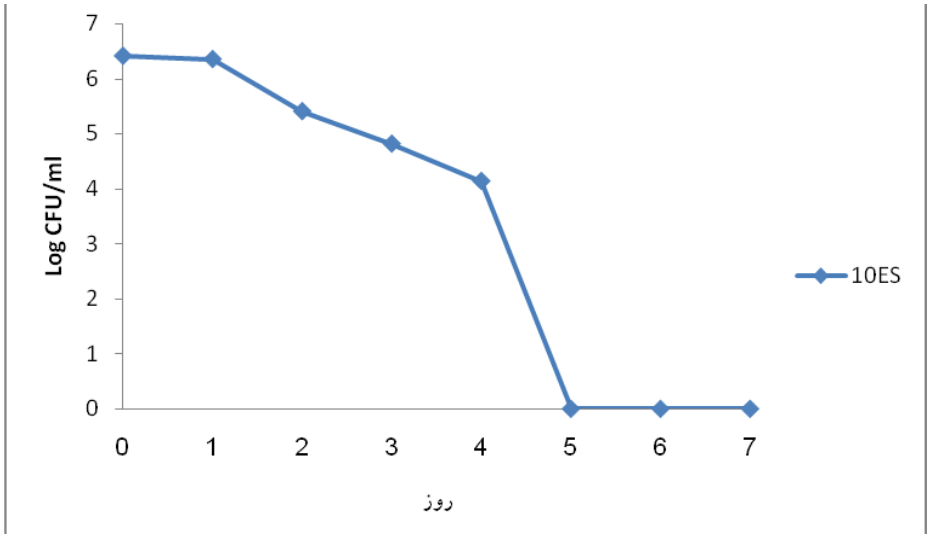
مقایسه نتایج ارائه شده در شکل ۱ و ۲ نشان می‌دهد که باکتری در روز ۳ پس از تلقیح، وارد حالت VBNC شده است.

بررسی کشت‌پذیری باکتری لیستریا در تیمار نمک ۱۰ درصد

نتایج بررسی کشت‌پذیری باکتری در محلول نمکی ۱۰ درصد در شکل ۳ ارائه شده است. طبق نتایج به‌دست آمده این باکتری در روز ۵ پس از تلقیح کشت‌پذیری خود را در محیط‌های اختصاصی کروموژنیک و محیط BHI آگار غنی‌شده‌با سدیم پیرووات از دست داد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

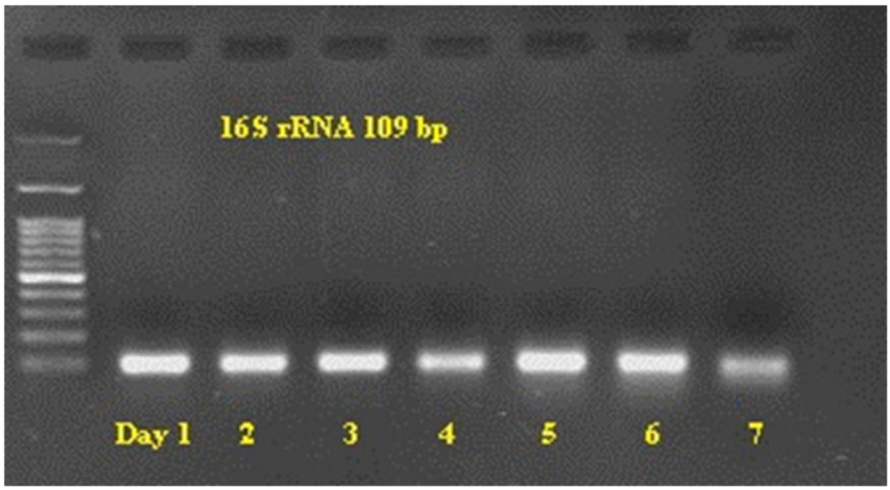


شکل ۳ بررسی قابلیت کشت باکتری *L. monocytogenes* در محیط کشت اختصاصی کروموژنیک و محیط BHI آگار غنی‌شده در تیمار 10ES(نمک ۱۰ درصد در دمای محیط)

نتایج بررسی بیان ژن *16SrRNA* باکتری در تیمار نمک ۱۰ درصد

نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتری لیستریا در تیمار 10ES در شکل ٤ نشان داده شده است.

طبق این نتایج ژن *16S rRNA* در این باکتری، پس از اینکه باکتری قابلیت کشت خود را از دست داد، ادامه داشت.



شکل ٤ نتایج بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتری لیستریا در تیمار 10ES (نمک ۱۰ درصد در دمای محیط)

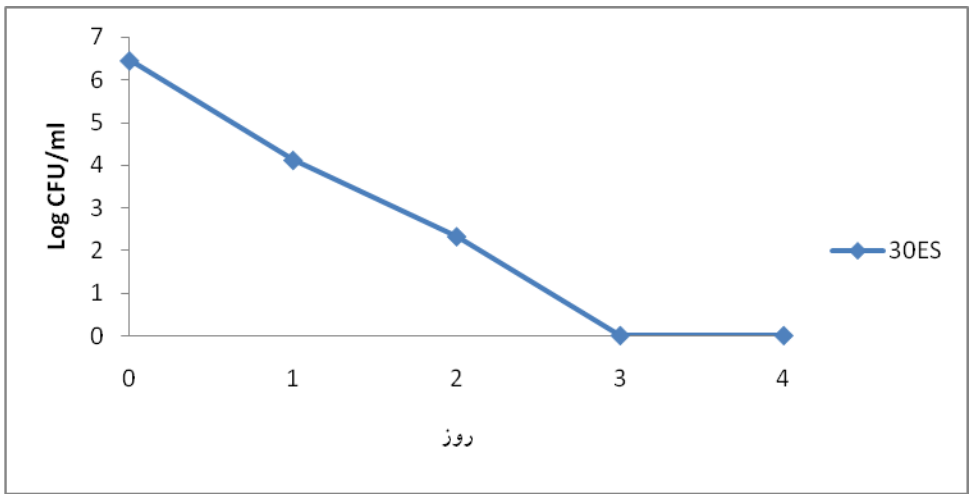
مقایسه نتایج شکل ۳ و ٤ نشان می‌دهد که باکتری در این تیمار در روز ۵ پس از تلقیح وارد حالت VBNC شده است.

نتایج بررسی کشت‌پذیری باکتری لیستریا در تیمار نمک ۳۰ درصد

طبق نتایج به‌دست آمده از بررسی کشت‌پذیری باکتری لیستریا روی محیط اختصاصی کروموژنیک و BHI غنی‌شده با سدیم پیرووات، این باکتری در روز ۳ پس از تلقیح به محیط حاوی ۳۰ درصد نمک، کشت‌پذیری خود را از دست داد. این نتایج در شکل ۵ نشان داده شده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

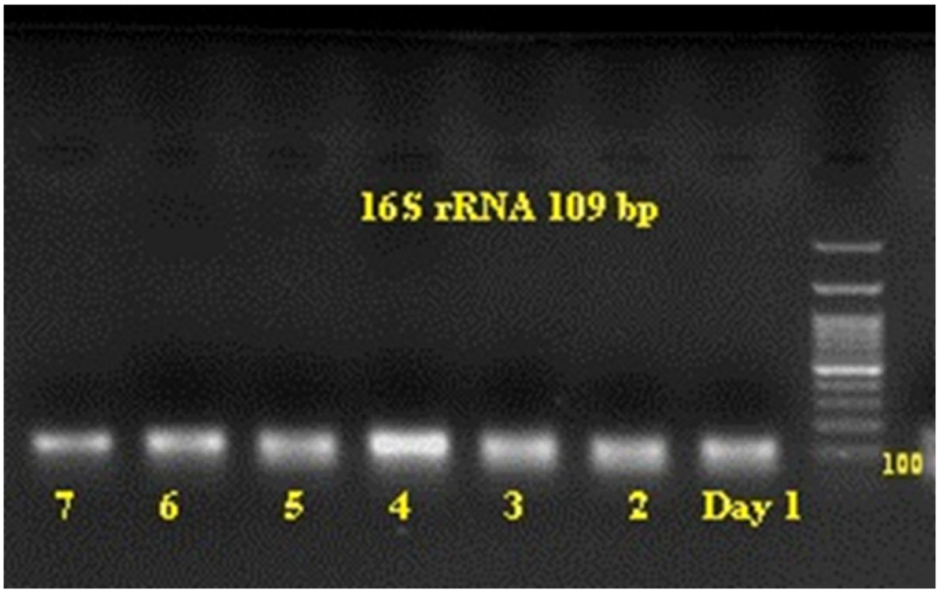


شکل ۵ نتایج روند تغییر کشت‌پذیری باکتری *L. monocytogenes* درتیمار 30ES (محلول نمکی ۳۰ درصددر دمای محیط)

نتایج بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتری در تیمار نمک ۳۰ درصد

نتایج به‌دست آمده از بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتری لیستریا در تیمار 30ES در شکل ٦ نشان داده شده است.

طبق این نتایج ژن *16S rRNA* در این باکتری، پس از اینکه باکتری قابلیت کشت خود را از دست داد، ادامه داشت.



شکل ٦ نتایج بررسی بیان ژن *16S rRNA* باکتری لیستریا در تیمار آب نمک 30ES (محلول نمکی ۳۰ درصددر دمای محیط)

مقایسه نتایج شکل ۵ و ٦ نشان می‌دهد که باکتری لیستریا در تیمار 30ES در روز ۳ وارد حالت VBNC شده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

بحث

نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد که باکتری *L. monocytogenes* 19115 در حضور ۳۰ درصد نمک طی مدت ۳ روز وارد حالت VBNC خواهد شد.

البته مدت زمانی که باکتری به حالت VBNC وارد شود، تفاوت‌هایی با نتایج دیگر محققان دارد که این امر ناشی از تفاوت شرایط آزمایش و نوع تیمارهای اعمال شده است. Besnard و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که باکتری *L. monocytogenes* در شرایط مختلف استرس نظیر شوری، دما و نور مدت زمان ورود به حالت VBNC متفاوت است. به‌طوری‌که در حضور نور خورشید و در معرض ۷ درصد نمک طی ١٤ روز وارد حالت VBNC می‌گردد، اما در همین شرایط بدون وجود نمک تنها طی ۷ روز VBNC می‌شود. با توجه به درصد بالای نمک استفاده شده در این پژوهش تسریع در ورود این باکتری به حالت VBNC طبیعی به‌نظر می‌رسد. در تیمار ۱۰ درصد نمک نیز مشاهده شد که باکتری طی ۵ روز وارد حالت VBNC شده است که این نتایج نیز با توجه به نزدیک بودن به نتایج Besnard و همکاران (Besnard et al., 2002)، منطقی به‌نظر می‌رسد.

در طرح حاضر، باکتری *L. monocytogenes* 19115در شرایط گرسنگی در دمای محیط طی مدت ۳ روز می‌تواند وارد حالت VBNC می‌شود. نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با نتایج سایر محققان در این زمینه مطابقت دارد. البته در شرایط مشابه نیز در آزمایش Besnard طی ۷ روز این باکتری VBNC شد و در این آزمایش ۳ روز طول کشید. این امر به‌دلیل مرحله ورود باکتری به حالت VBNC است. با توجه به اینکه در طرح حاضر باکتری در اواسط مرحلهٔ لگاریتمی در معرض شوک قرار گرفت و در آزمایش Besnard در مرحله سکون، ورود سریع‌تر باکتری در این پژوهش به حالت VBNC قابل درک است. تحقیقات نشان داده است که باکتری طی گذشتن از مرحلهٔ لگاریتمی رشد به مرحلهٔ سکون تغییراتی را در بیان ژن‌های سازگاری خود نشان می‌دهد. این مبحث به فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ (مسیرهایی که با دریافت علائم محیطی یا درون سلولی فعال شده و در نهایت با ترشح، افزایش یا کاهش پروتئین‌های ویژه موجب تنظیم شرایط درونی سلول می‌گردد) در این باکتری مربوط می‌شود(Hayes and Low, 2009).گزارش‌های ارائه شده در این زمینه دربارهٔ باکتری *L. monocytogenes* از مداخله ژنی به‌نام *sig b* حکایت دارد. این ژن فرمان‌های پاسخ به استرس‌های عمومی را صادر می‌کند و با کد کردن پروتئین‌های Sigma B که در تنظیم سازگاری سلول باکتری به شرایط استرس‌زا نقش دارند، فرایند سازگاری باکتری را کنترل می‌کند (Kusumoto et al., 2012; Wiedmann et al., 1998; Hain et al., 2008). ثابت شده است که این ژن کنترل مسیر سازگاری باکتری به استرس‌های موجود را از طریق اثر بر چندین ژن که هر کدام در استرس‌های مشخصی نقش بیشتری دارند، صورت می‌دهد. از جمله این ژن‌ها که در فرایند سازگاری به شوری نقش دارند اپرون opuCA است که در انتقال کارنیتین و تنظیم تعادل اسمزی عمل می‌کند (Fraser Sleator et al., 2001; (Sleator et al., 2003; and O'Byrne, 2002). با توجه به فعال شدن ژن *sigb* در مرحلهٔ سکون باکتری و صدور فرمان‌های عمومی سازگاری و مقاوم شدن باکتری به شرایط نامساعد (Boor and Chaturongakul, 2004)، این باکتریشوری اعمال شده طی ورود به حالت VBNC را بیشتر تحمل کرده و برای ورود به VBNC دیرتر تصمیم می‌گیرد. بنابراین سرعت بیشتر ورود به حالت VBNC در تیمارهای شوری و گرسنگی در طرح حاضر منطقی است. بررسی نحوه ورود باکتری در مرحلهٔ لگاریتمی رشد به حالت VBNC کمتر در پژوهش‌های گذشته بررسی شده است که با توجه به نوپا بودن پژوهش‌ها در این زمینه ارائه نتایج طرح حاضر در این باره نیز مفید فایده به‌نظر می‌رسد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

بنابراین مرز باکتری پس از عبور از میانه مرگ و زندگی به حالت VBNC می‌رسد که مجموعه‌ای از تغییرات و مکانیسم‌ها را هماهنگ کرده تا زنده بماند. دربارهٔ ورود به حالت VBNC در شرایط شوری ۳۰ درصد اولین شرط لازم سازگاری باکتری به حضور نمک است.

از مسائل مهم بحث برای این باکتری موضوع افزایش مقاومت این حالت باکتری به عوامل باکتریوسیدی نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها است(Oliver, 2010 ;Colwell et al., 2000; Nowakowska and Oliver, 2013; Li et al., 2014; Nowakowska and Oliver, 2013). این موضوع می‌تواند از نظر درمانی و درمانگاهی اهمیت داشته باشد. همچنین احتمال افزایش توانایی این حالت از باکتری در عبور از شرایط نامساعد که طی آماده‌سازی یا فراوری بعدی محصول غذایی ایجاد خواهد شد، اهمیت پرداختن به این موضوع را بیش از پیش مشخص می‌کند (Li et al., 2014). از طرفی بحث احیای باکتری‌های VBNC به حالت فعال،می‌تواندهشدار بهداشتی مهمی برای این باکتری‌ها باشد. همچنین حفظ قدرت پاتوژنز و یا بازیابی این ویژگی در باکتری‌های VBNC پس از فعال شدن، نگرانی‌ها دربارهٔ این باکتری‌ها را افزایش می‌دهد. در سال ۱۹۹۸ این نگرانی به شکلی عملی درخصوص مصرف تخم نمک سود شده ماهی (Roth et al., 1988) در ژاپنبه فاجعه منجر شد که مرگ و میر زیاد را در پی داشت (Makino et al., 2000).

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این طرح نشان می‌دهد ورود باکتری *L. monocytogenes* در شرایط شوری اشباع و همچنین شوری ۱۰ درصد می‌تواند هشداری جدی برای فرایندهای در نظر گرفته شده کنترل کیفیت میکروبی فراورده‌های نمک سود شده و دودی شده باشد. فرایند شور کردن که از گذشته برای نگهداری و افزایش ماندگاری مواد غذایی نظیر ماهی در همه دنیا استفاده می‌شد و هم اکنون نیز در ایران استفاده می‌شود، باوجود تصور عمومی بر کاهش خطرهای میکروبی ناشی از مصرف ماهی، می‌تواند جنبه دیگری از مشکلات میکروبی در این فراورده‌ها را تقویت کند.

منابع

Alipour, G., Shaabanpour, B., Shaabani, A., Imanpour, M., and others 2009. Effects of brine concentration and temperature on quality of Mahi sefid (Rutilus frisii kutum) smoked by traditional method. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 16:

Baars, W. 2012. Supersonic flow research; getting a doctorate degree in the United States of America.*Leonardo Times, 15 (Sept.) 2012*.

Basti, A.A., Misaghi, A., Salehi, T.Z., and Kamkar, A. 2006. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. *Food control* 17: 183–188.

Besnard, V., Federighi, M., Declerq, E., Jugiau, F., and Cappelier, J.-M. 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in Listeria monocytogenes. *Veterinary research* 33: 359–370.

Boor, K.J. and Chaturongakul, S. 2004. RsbT and RsbV Contribute to?` B-Dependent Survival under Environmental, Energy, and Intracellular Stress Conditions in Listeria monocytogenes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5349–5356.

Cappelier, J.M., Besnard, V., Roche, S., Garrec, N., Zundel, E., Velge, P., and Federighi, M. 2005. Avirulence of viable but non-culturable Listeria monocytogenes cells demonstrated by in vitro and in vivo models.*Veterinary research* 36: 589–599.

Di Ciccio, P., Meloni, D., Festino, A.R., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S. 2012. Longitudinal study on the sources of Listeria monocytogenes contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy.*International journal of food microbiology* 158: 79–84.

Colwell, R.R. and Grimes, D.J. 2000. Nonculturable microorganisms in the environment.ASM press.

Coutard, F., Pommepuy, M., Loaec, S., and Hervio-Heath, D. 2005.mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of Vibrio

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

chemical stimuli. *Journal of applied microbiology*, 110: 1601–1611.

Prevention, E.C. for D. and epidemiological report, C.A. 2014.food- and waterborne diseases and zoonoses ECDC (ed) stockholm.

Roth, W.G., Leckie, M.P., and Dietzler, D.N. 1988. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed Escherichia coli by betaine. *Applied and environmental microbiology*, 54: 3142–3146.

Sleator, R., Francis, G., O'Beirne, D., Gahan, C., and Hill, C. 2003. Betaine and carnitine uptake systems in *Listeria monocytogenes* affect growth and survival in foods and during infection. *Journal of applied microbiology*, 95: 839–846.

Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G., Abee, T., and Hill, C. 2001. Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 67: 2692–2698.

Sue, D., Boor, K.J., and Wiedmann, M. 2003. SigmaB-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes opuCA and lmo1421 and the conjugated bile salt hydrolase gene bsh in Listeria monocytogenes. *Microbiology*, 149: 3247–3256.

Tan, Q., Xu, H., Chen, T., Li, P., Aguilar, Z.P. and Xu, D. 2012. Differential expression of virulence and stress fitness genes during interaction between Listeria monocytogenes and Bifidobacterium longum.*Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76: 699–704.

Editorial team, E. and others 2015. The 2013 joint ECDC/EFSA report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks published. *Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles= European communicable disease bulletin* 20.

Valipour, A., Kanipour, A., KhadiviNiaMoghaddam, M., and Valinassab, T. 2011. Kutum: jewel of the Caspian sea. *Iranian Fisheries Research Organization, Tehran*.

Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., and Boor, K.J. 1998. General Stress Transcription Factor var sigmaB and Its Role in Acid Tolerance and Virulence ofListeria monocytogenes.*Journal of Bacteriology* 180: 3650–3656.

parahaemolyticus in viable but nonculturable state. *Journal of applied microbiology*, 98: 951–961.

Cunningham, E., O'Byrne, C., and Oliver, J.D. 2009. Effect of weak acids on Listeria monocytogenes survival: evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH. *Food control*, 20: 1141–1144.

Fraser, K.R. and O'Byrne, C.P. 2002. Osmoprotection by carnitine in a Listeria monocytogenes mutant lacking the OpuC transporter: evidence for a low affinity carnitine uptake system. *FEMS microbiology letters*, 211: 189–194.

Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S.S., Machata, S., Volk, U. and Wagner, S. 2008. Temporal transcriptomic analysis of the Listeria monocytogenes EGD-e σB regulon.*BMC microbiology*, 8: 20.

Hayes, C.S. and Low, D.A. 2009. Signals of growth regulation in bacteria.*Current opinion in microbiology*, 12: 667–673.

Jakobsson, R.F. 2014. Hef\dhbundnar reykingar á Íslandi: um reykingar matvæla og regluger\dhir \thar a\dh lútandi.

Kusumoto, A., Asakura, H., and Kawamoto, K. 2012. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in Salmonella enterica. *Microbiol.Immunol*. 56: 228–37.

Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., and Faucher, S.P. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens.*Front Microbiol* 5: 258.

Makino, S.-I., Kii, T., Asakura, H., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., and Itoh, K. 2000. Does Enterohemorrhagic Escherichia coliO157: H7 Enter the Viable but Nonculturable State in Salted Salmon Roe? *Applied and environmental microbiology*, 66: 5536–5539.

Nowakowska, J. and Oliver, J.D. 2013. Resistance to environmental stresses by Vibrio vulnificus in the viable but nonculturable state.*FEMS microbiology ecology*, 84: 213–222.

Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol.Rev*. 34: 415–25.

Pinto, D., Almeida, V., Almeida Santos, M., and Chambel, L. 2011. Resuscitation of Escherichia coli VBNC cells depends on a variety of environmental or

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 4, Winter 2017

The appearance of viable but non culturablestate in *Listeria monocytogenes* during fish brining

Mehdi Zolfaghari[1], Masoud Rezaei*[2], Mehdi Forozandeh Moghaddam[3], Ashraf Mohebbati Mobarez[4], Hedayat Hosseini[5]

1- PhD. Student, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Nur.
2- Professor, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Nur.
3- Associated Prof., Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical, Tarbiat Modares University, Tehran.
4- Associated Prof., Deptment of Medical Bacteriology, Faculty of Medical, Tarbiat Modares University. Tehran.
5- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran.

Received: 09.12.2015 Accepted: 01.03.2016

*Corresponding author: rezai_ma@modares.ac.ir

Abstract:
Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen which has high resistance for unfavorable conditions. This pathogen is able to entering Viable but non culturable (VBNC) state in harsh conditions. The present study was aimed to consider the possibility of entering this pathogen in to VBNC state in heavy brine which used for produce brined fish. For this purpose *L. monocytogenes*at 1.12×10^7 initial concentration as monitored in three treatments during 8 days: brine containing 30% salt (ES30), brine containing 10% salt (ES10) and starvation condition (DE). For considering alive cells method of gene expression of 16S rRNAby RT-PCR was used. The obtained results showed that this pathogen in ES30 and DE treatments after three days enter in to VBNC state. According to obtained results ES10 treatment entering in to VBNC state on 5 days after inoculation. The results showed that there is the possibility of *L. monocytogenes* entering in to VBNC state, during brined and smoked fish or every other brined food product and defect of Standard detection methods.

Keywords: Salt, Viable but non culturable (VBNC), *Listeria monocytogenes*, Salted fish

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-11-24]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.6.7]