Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 5 (November - December)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The Effect of Stressful Conditions on Culturability of *Listeria monocytogenes* in Food Matrix

Mehdi Zolfaghari[1], Masoud Rezaei[1], Mehdi Forozandeh Moghaddam[2], Ashraf Mohabbati Mobarez[2], Hedaiat Hosseini[3]

1. Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
2. Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medical, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/01/28
Accepted: 2016/07/25
Available online: 2017/11/20

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 2017; 11(5): 149-158

Corresponding author:

Masoud Rezaei

Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

Tel: 09111252159

Email:
rezai_ma@modares.ac.ir

Abstract

Background and Aims: *L. monocytogenes* is a foodborne pathogen which has a high ability for adapting to unfavorable conditions and is able to growth at refrigerator temperature. An important subject about these bacteria is entering into Viable but non-culturable (VBNC) state under stress. The aim of the present study is considering the culturability of this pathogen under refrigeration (4°C) in rainbow trout fillet matrix.

Materials and Methods: For this purpose bacteria was considered in four treatments: starvation at refrigerator temperature, starvation and high salinity at refrigerator temperature, fish fillet matrix at refrigerator temperature and salted fish fillet matrix at refrigerator temperature during time period by standard cultural methods and *16SrRNA* gene expression.

Results: The obtained results showed that starvation at refrigerator temperature and high salinity at refrigerator temperature treatments lost their culturability at 13 and 27 days, respectively. The results of gene expression of these bacteria also showed they enter in to viable but non culturable state. The results of fish fillet matrix at refrigerator temperature and fish fillet matrix at refrigerator temperature treatments showed that these bacteria in fish fillet matrix at refrigerator temperature keep their culturability and did not enter in to viable but non-culturable state.

Conclusions: Regarded to obtained results in this study could conclude that there is the entering possibility of *L. monocytogenes* in to VBNC state at refrigerator temperature in view point of bacteria environment and it is necessary to review the microbial quality control methods for refrigeration products.

KeyWords: *Listeria monocytogenes, Fish fillet, Refrigerator Temperature, VBNC*

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Zolfaghari M, Rezaei M, Forozandeh Moghaddam M, Mohabbati Mobarez A, Hosseini H. The Effect of Stressful Conditions on Culturability of Listeria monocytogenes in Food Matrix. Iran J Med Microbiol. 2017; 11(5):149-158

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۵ – اذر-دی ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

تأثیر شرایط استرس‌زا بر کشت‌پذیری *Listeria monocytogenes* در ماتریکس غذایی

مهدی ذوالفقاری[۱]، مسعود رضائی[۱]، مهدی فروزنده مقدم[۲]، اشرف محبتی مبارز[۲]، هدایت حسینی[۳]

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. گروه باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۰۸
پذیرش:۱۳۹۵/۰۵/۰۴
انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۸/۲۹
موضوع:
بیوتکنولوژی میکروبی

IJMM1396;11(5):149-158

نویسنده مسئول:
مسعود رضائی

گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس نور، تهران، ایران
تلفن: ۰۹۱۱۱۲۵۲۱۵۹

پست الکترونیک:
rezai_ma@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: باکتری *L. monocytogenes* از جمله پاتوژن‌های مواد غذایی است که قدرت سازگاری بالایی به شرایط نامساعد محیطی داشته و قادر به رشد در دمای یخچال می‌باشد. از موضوعات مهم مربوط به این باکتری، ورود به حالت «زنده اما غیرقابل‌کشت (VBNC)» تحت استرس‌های محیطی می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی قابلیت کشت‌پذیری این باکتری در شرایط دمایی یخچال (٤°C) در ماتریکس فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

مواد و روش کار: بدین منظور باکتری در ٤ تیمار گرسنگی در دمای یخچال، گرسنگی و شوری بالا در دمای یخچال، باکتری در ماتریکس فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای یخچال و باکتری در ماتریکس فیله ماهی شور شده در دمای یخچال طی دوره زمانی با روش‌های کشت استاندارد و بررسی بیان ژن *16S rRNA* بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که تیمار گرسنگی در دمای یخچال و تیمار گرسنگی و شوری بالا در دمای یخچال به ترتیب در روزهای ۱۳ و ۲۷ کشت پذیری خود را از دست دادند. از طرفی بررسی بیان ژن این باکتری‌ها نشان داد این باکتری‌ها وارد حالت زنده اما غیرقابل‌کشت (*VBNC*) شدند. نتایج تیمارهای ماهی در دمای یخچالو ماهی شور شده در دمای یخچال نشان داد که این باکتری در شرایط ماتریکس فیله ماهی در دمای یخچال کشت پذیری خود را حفظ نموده و وارد حالت زنده اما غیر قابل کشت نخواهد شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* ATCC 19115 به حالت VBNC در دمای یخچال با توجه به شرایط محیط‌زیست باکتری وجود داشته و لازم است که روش‌های کنترل کیفیت میکروبی محصولات یخچالی مورد بازبینی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Listeria monocytogenes*، فیله ماهی، دمای یخچال، VBNC

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

مقدمه

Listeria monocytogenes باکتری گرم مثبت، غیر اسپورزا و بی‌هوازی اختیاری است. این پاتوژن، اولین بار توسط Murray و همکاران در سال ۱۹۲۶ توصیف گردید (۱). میزان مرگ و میر در بین افراد مبتلا شده به این پاتوژن حدود ۳۰ درصد است که آن را به دومین پاتوژن غذازاد که باعث بیشترین مرگ و میر در آمریکا، ایرلند و سراسر اروپا می‌شود، مبدل ساخته است (۲). به گزارش European Food Safety Authority (ESFA) بیشترین آلودگی دیده شده در اروپا، در محصولات گوشتی آمادهٔ مصرف، به ویژه محصولات شیلاتی آماده مصرف بوده است. این گونه محصولات اغلب به‌منظور افزایش مدت زمان ماندگاری در دمای یخچال قرار می‌گیرند که پاتوژن *L. monocytogenes* قادر به رشد در این دما است (۳).

کشت یکی از اساسی‌ترین مراحل تشخیص در میکروبیولوژی است و روش شمارش کلونی روی پلیت از روش‌های استاندارد کشت برای شمارش باکتری‌های زنده است (۴). با این حال در سال ۱۹۸۲ برای اولین بار کشف شد که باکتری‌های *E. coli* و *Vibrio cholera* می‌توانند به یک حالت متفاوت که «زنده اما غیرقابل‌کشت» یا viable but non-culturable (VBNC) نامیده می‌شود، وارد شوند (۵). این حالت برای باکتری‌هایی رخ می‌دهد که غیراسپورزا بوده و در معرض عوامل نامساعد و تنش‌های

محیطی قرار می‌گیرند (۶). برخلاف سلول‌های نرمال که روی محیط‌های مناسب قابلیت کشت و تولید کلونی دارند، سلول‌های VBNC سلول‌هایی زنده هستند که قابلیت رشد روی محیط‌های متداولی که به‌طورمعمول روی آن‌ها رشد می‌کنند را از دست داده‌اند (۵). علی‌رغم غیرقابل‌کشت بودن روی محیط‌های نرمال، سلول‌های VBNC به عنوان سلول‌های مرده، به دلیل تفاوت‌های مختلف، به شمار نمی‌آیند. سلول‌های VBNC تفاوت‌های بسیاری با سلول‌های مرده دارند که از آن جمله می‌توان به غشاء سالم و حفظ اطلاعات ژنتیکی و بیان ژن در این‌گونه سلول‌ها (۷)، متابولیسم فعال و تنفس (۸) و سطح بالای ATP حتی تا یک سال پس از ورود به حالت VBNC (۹) در این سلول‌ها اشاره نمود. آنچه در این میان مهم به نظر می‌رسد این است که، متغیرها و شرایطی که در فرآوری و نگهداری مواد غذایی به عنوان عوامل افزایش ماندگاری و کنترل‌کننده عوامل میکروبی به‌حساب آمده و مورد استفاده قرار می‌گیرند، همه می‌توانند به عنوان شرایطی باشند که طی آن‌ها باکتری قدرت کشت پذیری خود را از دست داده و وارد حالت VBNC می‌شود (۱۰). البته خصوصیات فیزیک و شیمیایی غذا باکتری‌ها را قادر به زنده ماندن و تشکیل کلونی می‌نماید. این قبیل ویژگی‌ها که به عنوان فاکتورهای ذاتی تعریف می‌شوند نظیر pH، پتانسیل احیاء (غلظت اکسیژن) و فعالیت آبی a_w می‌باشد. این امر نقش ماتریکس غذایی را در واکنش فیزیولوژیکی باکتری نشان می‌دهد (۱۱). یکی از شرایطی که بسیار در افزایش ماندگاری مواد غذایی مطرح است دمای پایین یخچال می‌باشد. آنچه مشخص است، مقاومت برخی باکتری‌ها به عوامل نامساعد محیطی به ویژه دمای پایین می‌باشد که در این میان، باکتری *L. monocytogenes*، از جمله پاتوژن‌هایی است که نه‌تنها دمای پایین را تحمل، که حتی می‌تواند در دمای یخچال (هرچند با سرعت کم) رشد نماید (۱۲). علاوه بر استفاده تولیدکنندگان از دمای پایین در فرآیند انتقال، تولید و نگهداری مواد غذایی، شرایط دمای پایین به صورت طبیعی نیز در محیط برای این باکتری در فصول سرد رخ می‌دهد. آنچه در این میان اهمیت دارد. دانستن این موضوع است که آیا رفتار باکتری لیستریا در مقابل دمای پایین محیط همیشه یکسان است و به‌راحتی به رشد و تکثیر خود در هر شرایطی در دمای پایین ادامه می‌دهد یا استراتژی دیگری را نیز می‌تواند در این شرایط داشته باشد. بنابراین هدف از پژوهش حاضر بررسی قدرت کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در دمای یخچال در شرایط فقر غذایی و ماتریکس مواد غذایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

سویه مورد مطالعه

مطالعه حاضر در سال ۱۳۹۱ صورت پذیرفت. باکتری *L. monocytogenes* سویه استاندارد ATCC 19115 (سروتایپ 4b)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری‌ها سپس در محیط BHI (مرک، آلمان) برای به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوباسیون شدند. سپس روی محیط BHI آگار کشت شدند و ۲۴ ساعت در ۳۷°C انکوباسیون شدند. بعد با استفاده از لوپ تک کلونی خالص از آن برای ادامه مطالعات استفاده شد.

آزمون‌های تأییدی باکتری

باکتری تهیه شده آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، بررسی همولیزکنندگی روی آگار خون‌دار و بررسی حضور ژن *16SrRNA* اختصاصی این باکتری با آزمون PCR مورد تأیید قرار گرفت.

آماده‌سازی باکتری‌ها جهت تلقیح به محیط‌های کشت

برای تلقیح تیمارها، یک کلونی خالص باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براث منتقل شد و در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ rpm در ۳۷°C انکوباسیون شروع گردید. رشد باکتری‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتورمتر (Biochrom WPA, UK) در OD_{600} nm کنترل گردید و باکتری‌ها در جذب حدود ۰/۴ که معادل تقریباً ۵×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر است جهت تلقیح استفاده شدند. در این میزان جذب باکتری‌ها تقریباً در اوایل تا اواسط مرحله رشد لگاریتمی می‌باشند (۱۳). هم‌زمان با بررسی میزان جذب با اسپکتروفتومتر، کشت باکتریایی نیز روی محیط BHI آگار صورت گرفت و پلیت‌ها پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون مورد شمارش قرار گرفتند. جذب ۰/۴ در حدود ۶ ساعت پس از تلقیح به دست آمد.

آماده‌سازی محیط‌های مورد بررسی

به منظور بررسی رفتار باکتری در تیمارهای فقر مواد غذایی (RD) از محیط آب مقطر در دمای ۴°C، تیمار شوک شوری در دمای ۴°C (RS) با استفاده از آب‌نمک ۳۰ درصد و تیمارهای ماتریکس گوشت ماهی از فیله ماهی در دمای ۴°C (RF) و فیله ماهی در دمای ۴°C بانمک ۳۰ درصد (RFS) استفاده شد.

آماده‌سازی گوشت و تلقیح باکتری به فیله ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان زنده از بازار مربوطه خریداری و به همراه یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس ماهی‌ها فیله شدند و فیله‌ها را به قطعات حدود ۱۰ گرمی تقسیم نموده و در پلیت‌های یک‌بارمصرف استریل قرار داده شدند. بعد از سوسپانسیون باکتریایی آماده‌شده با غلظت $۱۰^{۷} \times ۸$ باکتری در هر میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰Lµ به هر قطعه گوشت با استفاده از سمپلر تلقیح گردید و گوشت آلوده در پلیت‌های استریل به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق زیر هود استریل قرار داده شد تا باکتری‌ها فرصت کافی جهت تثبیت روی گوشت را داشته باشند. سپس هر قطعه گوشت به صورت جداگانه وارد محلول آب نمک ۳۰ درصد با نسبت گوشت به آب نمک ۱ به ۳ (وزنی/حجمی) در لوله‌های فالکن استریل قرار داده شد. بعد نمونه‌های آماده‌شده در دمای اتاق نگهداری شده و در زمان‌های مورد نظر نمونه‌برداری از آن‌ها صورت پذیرفت. پلیت‌های استریل حاوی گوشت آلوده جهت بررسی اثر دمای سرد، به همان صورت در بسته‌بندی‌های پلاستیک در درمای یخچال (۴ °C) نگهداری شدند.

نمونه‌برداری از گوشت

نمونه‌برداری از تیمارها در زمان ۰ (بعد از تلقیح) روز ۱، ۲، ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۷، ۲۴، ۳۰ صورت پذیرفت. البته نمونه‌برداری از نمونه‌های تیمار گرسنگی با فواصل کمتر و با توجه به نتایج هر دوره نمونه‌برداری تنظیم می‌شد. جهت نمونه‌برداری از گوشت ابتدا نمونه به مدت ۱ دقیقه در استومیکر همگن شد سپس Lµ ۱۰۰ از آن به‌منظور بررسی کشت باکتریایی، ۱ میلی‌لیتر به‌منظور استخراج RNA جهت بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد.

کشت پذیری

به‌منظور بررسی حضور باکتری‌های کشت پذیر روی محیط BHI آگار غنی‌شده با ۰/۶ درصد عصاره مخمر و ۰/۱ درصد سدیم پیروات، به‌منظور احیاء احتمالی باکتری‌های زنده صدمه‌دیده و محیط اختصاصی لیستریا کروموژنیک آگار کشت داده شدند. به‌منظور تعیین زنده‌بودن باکتری‌ها از بررسی کیفی بیان ژن *16S rRNA* استفاده گردید.

بررسی حضور باکتری زنده با RT-PCR ژن *16SrRNA*

به‌منظور بررسی حضور باکتری زنده در تیمارها، از روش بررسی بیان ژن به عنوان دقیق‌ترین شاخص شناخته‌شده برای بررسی زنده‌بودن باکتری‌ها استفاده گردید (۷). بدین منظور از RT-PCR ژن *16SrRNA* استفاده شد. برای این هدف ابتدا ۱ میلی‌لیتر از نمونه گوشت همگن‌شده در دور ۷۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و در ادامه پلیت حاصل که حاوی باکتری نیز بود مورد لیز سلولی و استخراج RNA قرار گرفت و فرآیند RT-PCR و الکتروفورز طبق روش‌های مشروح در بخش‌های مربوطه صورت پذیرفت.

استخراج RNA باکتری

بدین منظور از کیت Sinapure RNA (Sinaclon, Iran) استفاده گردید که مراحل آن طبق پروتکل شرکت صورت پذیرفت.

برای حذف DNA ناشی از آلودگی با استفاده از کیت *DNase* I (Sinaclon, Iran) به شرح زیر استفاده گردید.

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

سنتز cDNA

جهت انجام RT-PCR ابتدا نیاز است cDNA از روی mRNA موجود در نمونه RNA استخراجی سنتز گردد. به‌منظور سنتز cDNA از کیت Mastermix RT PCR (شرکت کیاژن طب صدرا، ایران) استفاده شد. بدین منظور Lµ ۱ رندوم هگزامر به Lµ ۱۰ از RNA تیمار شده با *DNase* I اضافه شده و ۵ دقیقه در ۷۰°C انکوباسیون گردید. سپس نمونه روی یخ سرد شده و Lµ ۱۰ از محلول آماده کیت سنتز cDNA به آن اضافه شد. این نمونه به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷°C انکوباسیون گردید. درنهایت نمونه حاوی cDNA سنتز شده می‌باشد.

cDNA سنتز شده به‌منظور انجام فرآیند PCR استفاده شد.

فرآیند PCR

به‌منظور انجام عملیات PCR از کیت Prim Taq Premix (2X) (Kiageneteb Sadra, Iran) استفاده شد.

برای آماده‌سازی جهت انجام عملیات PCR به صورت زیر اجزاء واکنش را اضافه گردید:

پرمیکس پرایم تک به مقدار Lµ ۱۰، DNA الگو Lµ ۳، مخلوط پرایمر Forward و Reverse به مقدار Lµ ۱ (هر کدام با غلظت ۵ پیکو مولار) و حجم نهایی با استفاده از آب دیونیزه

استریل به Lµ ۲۰ رسید. مخلوط را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ جزئی شد تا قطراتی که روی جداره میکروتیوپ بود، حذف شود. سپس این میکروتیوب را در دستگاه PCR قرار داده و تنظیمات دستگاه را به صورت زیر انجام شد. توالی پرایمرهای مورداستفاده در این پژوهش به صورت زیر بود (۱).

F:TTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGG
R:GTGTGTAGCCCAGGTCATAAGG

مرحله ۱: واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس. مرحله ۲: تکثیر DNA به تعداد ۳۵ چرخه: الف) واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس ب) اتصال پرایمر: ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سلسیوس ج) گسترش: ۳۰ تا ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس. مرحله ۳: باز سرشت نهایی: ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس.

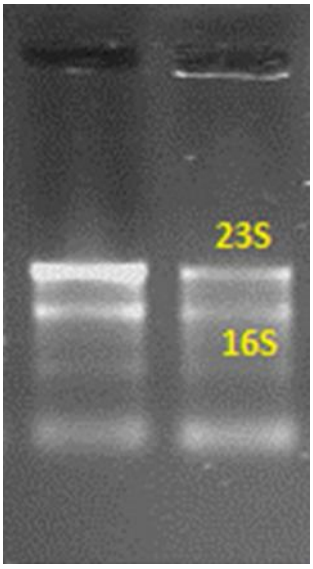
الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل آگارز صورت پذیرفت و سپس ژل با استفاده از دستگاه ژل داک (Biometra, Germany) عکس‌برداری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

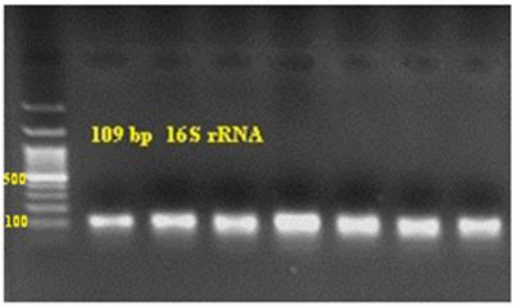
این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت پذیرفت. تمام آزمایش ۲ نوبت تکرار و هر نوبت با ۳ تکرار انجام شد. نتایج حاصله با روش‌های ANOVA مورد ارزیابی و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD صورت پذیرفت. در مواقع لزوم آزمون ناپارامتریک کای اسکوور برای آنالیز نتایج استفاده شد. تمام آنالیزها در سطح اطمینان ۵ درصد صورت پذیرفت. نتایج به‌دست‌آمده با ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل صورت پذیرفت.

یافته‌ها

نتایج بررسی بیان ژن *16SrRNA* در باکتری لیستریا و الکتروفورز محصول PCR در شکل ۱ نشان داده‌شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است استخراج RNA، بررسی بیان این ژن در باکتری لیستریا و عملکرد پرایمرها، قابل قبول می‌باشد.



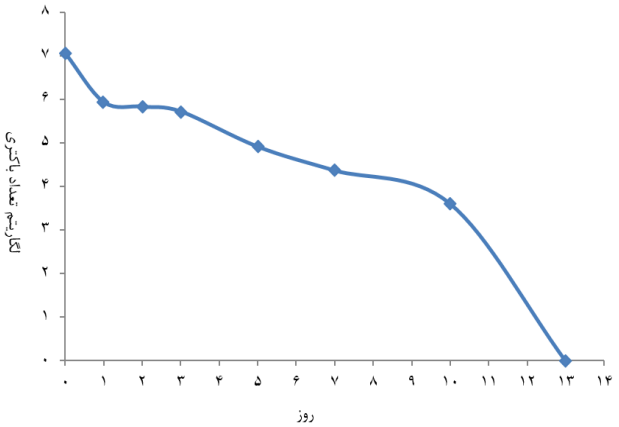
الف



ب

شکل ۱. الف: تأیید کیفیت RNA استخراج شده با مشاهده باندهای 16S و 23S. ب) الکتروفورز محصول PCR از cDNA سنتز شده از RNA استخراجی باکتری.

نتایج کشت پذیری باکتری‌های تلقیح شده به محیط با شرایط گرسنگی در دمای پایین نشان داد که این باکتری در دمای پایین در روز ۱۳ کشت پذیری خود را از دست داد (شکل ۲).



شکل ۲. نتایج روند تغییر کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در تیمار شرایط گرسنگی در دمای ۴°C (یخچال).

نتایج بررسی روند تغییر کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در شرایط گرسنگی در شوری ۳۰ درصد در دمای یخچالی در شکل ۳ قابل‌مشاهده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده، این باکتری در روز ۲۷ پس از تلقیح قابلیت کشت خود را از دست داد.

شکل ۳. نتایج روند تغییر کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در شرایط گرسنگی، دمای ۴°C (یخچال) و شور ۳۰ درصد.

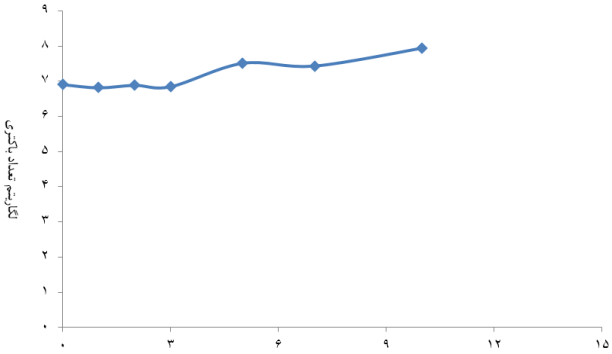
نتایج بررسی زنده‌بودن باکتری با استفاده از روش بررسی بیان ژن *16SrRNA* در تیمارهای گرسنگی در دمای یخچال در جدول ۱ نشان داده‌شده است. طبق این نتایج باکتری در تیمارهای RD و RS در تمام طول دوره بررسی بیان ژن *16SrRNA* ادامه داشت ($P<0/05$).

جدول ۱. نتایج بررسی حضور باکتری زنده با روش بررسی بیان ژن *16S rRNA* در تیمارهای گرسنگی

تیمار / زمان (روز)	RD	RS
۰	+	+
۱	+	+
۲	+	+
۳	+	+
۵	+	+
۷	+	+
۱۰	+	+
۱۳	+	+
۱۷	+	+
۲۴	+	+
۲۵	+	+
۲۷	+	+
۳۱	+	+
۴۱	+	+

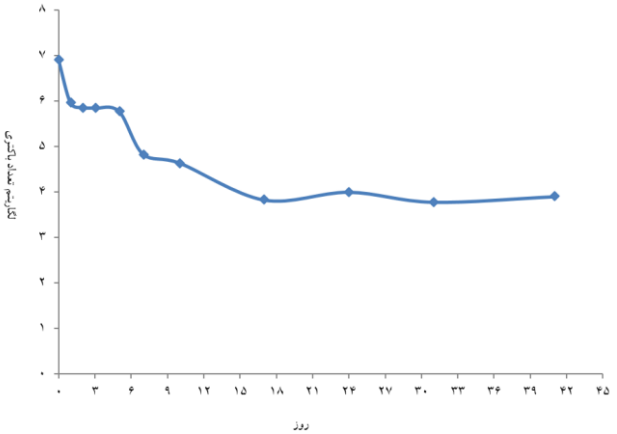
از مقایسه نتایج شکل‌های ۲ و ۳ با جدول ۱ می‌توان به این نتیجه رسید که باکتری *L. monocytogenes* در تیمار RD در روز ۱۳ و در تیمار RS در روز ۲۷ وارد حالت VBNC شده است.

کشت نمونه‌های گوشت آلوده شده با باکتری *L. monocytogenes* که در دمای یخچال نگهداری شده بودند نشان داد که این باکتری در دمای یخچالی نه‌تنها رشدش متوقف نشده و کشت پذیری خود را حفظ می‌کند، بلکه تعدادش افزایش نیز می‌یابد. این نتایج در شکل ۴ نشان داده‌شده است. قابل‌ذکر است که با توجه به فساد گوشت و عدم توجیه بررسی، پس از روز ۱۰ این تیمار دیگر موردبررسی قرار نگرفت.



شکل ۴. نتایج روند تغییر کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در شرایط دمای ۴°C (یخچال) در محیط گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

بررسی نمونه‌های فیله ماهی شور شده در دمای یخچال که با باکتری *L. monocytogenes* تلقیح شدند، نشان داد که این باکتری در شرایط ذکرشده قابلیت کشت پذیری خود را حفظ می‌کند. هرچند تعداد این باکتری با توجه به تنش شوری کاهش یافت ($P<0/05$). این نتایج در شکل ۵ قابل‌مشاهده است.



شکل ۵. نتایج روند تغییر کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در شرایط شوری بالا در محیط گوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴°C (یخچال)

نتایج بررسی زنده بودن باکتری با استفاده از روش بررسی بیان ژن *16SrRNA* در تیمارهای ماتریکس فیله ماهی در دمای یخچال در جدول ۱ نشان داده‌شده است. طبق این نتایج باکتری در تیمارهای RF و RFS در تمام طول دوره بررسی بیان ژن *16SrRNA* ادامه داشت ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲. نتایج بررسی حضور باکتری زنده با استفاده از بررسی بیان ژن 16S *rRNA* در تیمارهای ماتریکس ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

تیمار / زمان (روز)	RF	RFS
۰	+	+
۱	+	+
۲	+	+
۳	+	+
۵	+	+
۷	+	+
۱۰	+	+
۱۷	N	+
۲۴	N	+
۳۱	N	+
۳۸	N	+

ES: تیمار تحت شوری بالا در شرایط دمای محیط؛ CD: تیمار تحت شرایط گرسنگی در دمای یخچال؛ ED: تیمار تحت شرایط گرسنگی در دمای محیط. علامت + نشان‌دهنده حضور باکتری زنده و علامت – نشان‌دهنده عدم حضور باکتری زنده و N: عدم بررسی نمونه، می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در شکل‌های ۴ و ۵ و جدول ۲ می‌توان نتیجه گرفت که قابلیت کشت باکتری در شرایط ماتریکس فیله ماهی قزل‌آلا در دمای یخچال تغییری نخواهد کرد.

بحث

روش کشت مستقیم باکتری روی محیط کشت اگرچه روشی سریع و آسان است، اما به دلیل عدم دقت کافی به ویژه در مورد باکتری‌های صدمه‌دیده موردتردید قرار دارد (۴). با توجه به اثبات ورود برخی باکتری‌ها به حالت VBNC این روش با چالشی جدی روبرو است (۱۱) که اثبات ورود باکتری لیستریا به این حالت نیز می‌تواند نیاز به تغییر روش‌های تشخیصی این باکتری را نمایان سازد.

ورود باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC در دمای یخچال در این پروژه نیز با نتایج Besnard و همکاران (۸) هم‌خوانی دارد. Lindback و همکاران (۹) طی مطالعه‌ای به بررسی امکان ورود ۱۶ سویه باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC پرداختند. این سویه‌ها شامل جداره‌های کلینیکی، سویه‌های جداشده از ماهی سالمون، سویه جداشده از ضایعات ماهی سالمون و دوسویه استاندارد EGDe و Scott A بود. طبق گزارش این پژوهشگران همه سویه‌های مورد بررسی طی ۵ تا ۱۲ هفته در دمای یخچال وارد حالت VBNC شدند. Cappelier و همکاران (۱۵) نیز ورود *L. monocytogenes* به حالت VBNC را شرایط گرسنگی و دمای ۴°C گزارش کردند. البته قابل‌ذکر است که سویه‌های مورد بررسی در پروژه حاضر (سروتایپ 4b) متفاوت از سویه‌های مورد بررسی در گزارش این پژوهشگران (سروتایپ 1/2a) بود.

ورود باکتری به حالت VBNC قبل از هر چیزی به قدرت مقابله آن با شرایط استرس ایجاد شده بستگی دارد. در صورت توانایی بر غلبه بر آن شرایط نامساعد به تدریج می‌تواند وارد حالت VBNC گردد و این موضوع نقش مهمی در زنده‌مانی این باکتری در شرایط سخت طبیعت دارد (۱۶).

عدم تکثیر و کشت پذیری باکتری موجب عدم‌تشخیص آن در فرآیندهای کنترل کیفیت میکروبی مواد غذایی می‌شود که می‌تواند چالشی جدی ازنظر بهداشت و سلامت غذایی باشد (۱۰). با توجه به امکان احیاء باکتری‌های VBNC و بازیابی قابلیت کشت و تکثیر، این موضوع از اهمیت بالایی درباره بیماری‌زایی باکتری برخوردار است (۶). باکتری‌های VBNC تحت اثر Rpf قادر به احیاء به حالت کشت‌پذیر و فعال را دارند (۱۰). این مسئله به ویژه در مورد باکتری لیستریا از آن نظر اهمیت پیدا می‌کند که ثابت‌شده است باکتری VBNC لیستریا قدرت احیاء شده در مجاورت جنین تخم‌مرغ را دارد (۱۷). با توجه به بیماری‌زایی باکتری لیستریا به ویژه خطر آن در زنان باردار که منجر به سقط‌جنین و مننژیت می‌شود، این موضوع بسیار حیاتی می‌باشد (۱). کما اینکه درگذشته اتفاقات مهمی نیز در مورد این‌چنین باکتری‌هایی ثبت‌شده است. در یک شیوع بیماری در ژاپن، به خاطر آلودگی تخم ماهی سالمون نمک‌سود شده به *E. coli* O157 در حالت VBNC، امکان احیاء برخی پاتوژن‌ها از حالت VBNC به حالت کشت‌پذیر در محیط invivo و حفظ بیماری‌زایی آن‌ها اثبات شد (۱۸). Asakura و همکاران نیز گزارش کردند که اسکویید نمک‌سود و خشک‌شده آلوده به *Salmonella enteric* subsp. enteric Oranienburg، عامل شیوع و ابتلا در ژاپن در سال ۱۹۹۹، به دلیل عدم کارایی روش‌های کشت باکتری برای تشخیص باکتری‌های VBNC این محصول بوده است. زیرا در بررسی آن کمتر از ۲۰ سلول قابل‌کشت از نمونه اسکویید نمک‌سود شده با روش کشت روی پلیت مشاهده

شد که این تعداد، سپتی سمی مشاهده‌شده در بیماران را توجیه نمی‌کرد، اما روش برآورد BacLight نشان داد که بیش از ۹۰درصد جمعیت باکتریایی زنده‌بودن. بنابراین این فرضیه که شیوع بیماری ناشی از باکتری‌ها در حالت VBNC بر اساس برآورد کشت پذیری سلول‌ها امکان‌پذیر نیست، اثبات گردید (۱۹).

نتایج پروژه حاضر نشان داد که این باکتری در دمای پایین (۴°C) و همچنین در حضور نمک در دمای پایین در گوشت ماهی وارد حالت VBNC نمی‌شود. این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران در این زمینه مطابقت دارد. طبق گزارش Neunlist و همکاران نمک‌سود کردن در دمای پایین و دودی کردن به روش سرد در ماهی سالمون موجب القاء حالت VBNC در باکتری لیستریا نمی‌شود. آن‌ها همچنین گزارش کردند که قدرت ورود این باکتری به طحال در موش پس از دوره نگهداری ۱۰ روز در دمای ۴°C و ۱۸ روز در ۸°C کاهش می‌یابد (۲۰). عدم ورود باکتری به حالت VBNC در دمای پایین در گوشت ماهی با نتایج به‌دست‌آمده در پروژه حاضر مطابقت دارد. این امر به دلیل نرخ متابولیکی پایین باکتری در دمای پایین و در نتیجه تأثیرپذیری کمتر از شرایط محیط و همچنین حضور در محیط گوشت که خود می‌تواند به سازگاری باکتری با شرایط سرما و نمک بالا کمک کند می‌باشد. البته لازم به ذکر است که در مورد ورود باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC در شرایط شوری مطالعات اندکی صورت گرفته است، هرچند که این موضوع در مورد برخی باکتری‌های دیگر کاملاً بررسی و حتی مدل‌سازی شده است (۲۱).

Neunlist و همکاران با بررسی زنده‌مانی باکتری *L. monocytogenes* طی فرآوری و همچنین پس از فرآوری ماهی‌دودی شده به روش سرد گزارش کردند که مرحله نمک‌سود کردن اثر باکتریوسیدی ضعیفی از خود نشان می‌دهد اما مرحله دودی کردن اثر باکتریوسیدی بر این باکتری نداشته و تنها باعث کاهش رشد باکتری برای مدت محدود می‌گردد (۲۰).

توانایی *L. monocytogenes* برای رشد در دمای یخچال برای فرآوری کننده‌های غذا مشکل‌زا است (۱). مطالعات مکانیسم غشاء سلول‌های باکتریایی و اسموپروتکتانت‌ها برای توضیح اینکه چگونه این عملکردهای فیزیولوژیکی‌اش را در محیط‌های سرد حفظ می‌کند، به ما کمک خواهد کرد. فسفولیپیدهای غشاء باید در یک حالت مایع-کریستالی باقی بمانند تا سیالیت غشاء حفظ شود و بنابراین بتواند در دمای پایین رشد کند. ترکیب اسید چرب برای اینکه غشاء در چنین حالتی باقی بماند تعیین کننده خواهد بود. غشاء *L. monocytogenes* حاوی بیش از ۹۵ درصد اسیدهای چرب منشعب است (۲۲). وقتی که باکتری در ۳۷°C رشد می‌کند، اسیدهای چرب اصلی anteiso-$C_{15:0}$ (۴۱ تا ۵۲٪)، anteiso-$C_{17:0}$ (۲۴ تا ۵۱٪) و iso-$C_{15:0}$ (۲ تا ۱۸٪) هستند. وقتی که در ۵°C رشد می‌کنند، شکل antesio-$C_{15:0}$ گروه اصلی و غالب در اسیدهای چرب غشاء می‌شود که ۶۵ تا ۸۵درصد کل اسیدهای چرب غشاء را شامل می‌شود. وقتی پاتوژن در حضور گلایسین بتائین رشد می‌کند، بالاترین مقادیر anteiso-$C_{15:0}$ در غشاء دیده می‌شود. رشد *L. monocytogenes* در دمای پایین در حضور گلایسین بتائین و کارنیتین تحریک می‌شود (۲۳). وقتی *L. monocytogenes* در ۴°C رشد کرده افزودن ۱۳۰µM گلایسین بتائین نرخ رشد مخصوص را تقریباً دو برابر می‌کند (۲۴). لیستریا گلایسین بتائین و کارنیتین را سنتز نمی‌کند، اما این ترکیبات را از محیط وارد می‌کند (۲۵). در غذاهای با منشأ حیوانی دامنه وسیعی از کارنیتین وجود دارد، گوشت‌های فرآوری شده (سوسیس و برگر) و سرشیر به ترتیب حاوی ۲۳۰ تا ۹۵۰ و ۱۲۰ تا ۱۴۰ nmol/g کارنیتین آزاد هستند. بنابراین مقاومت بیشتر باکتری لیستریا در گوشت ماهی در مقابل عوامل نامساعد شوک اسمزی قابل درک است. Novakowska و Oliver نیز طی گزارش به موضوع افزایش مقاومت باکتری‌های VBNC نسبت به عوامل استرس‌زای محیطی پرداختند و گزارش کردند که این باکتری‌ها در مقابل شرایط سخت محیطی قدرت تحمل بیشتری نسبت به حالت فعال خود دارند (۲۶). قابل‌ذکر است که نتایج پروژه حاضر با گزارش Makino و همکاران (۱۸) در مورد تخم نمک‌سود ماهی سالمون همخوانی نداشته که البته قابل‌مقایسه نیز نیست. زیرا دمای موردبررسی در این آزمایش دمای یخچال بوده و مقاومت باکتری لیستریا در مقابل شرایط نامساعد محیطی، به دلیل کاهش متابولیسم آن افزایش می‌یابد (۲۷). با توجه به اطلاعات اندکی که در مورد حالت VBNC باکتری *L. monocytogenes* در حال حاضر موجود است و تحقیقات بین‌المللی نیز در این زمینه هنوز در مراحل ابتدایی خود می‌باشد، بحث و بررسی بیشتر این موضوع با پژوهش‌های بیشتر امکان‌پذیر می‌شود. امید است که با شروع این پژوهش‌ها در داخل کشور نیز اهمیت بهداشتی باکتری‌های VBNC هرچه بیشتر برای مجامع علمی و اجرایی تبیین گردد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی می‌توان از نتایج پروژه حاضر چنین استنباط نمود که امکان ورود باکتری تغییر کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* در شرایط نامساعد محیطی نظیر دمای یخچال و شوری بالا وجود دارد و این موضوع اهمیت معرفی روش‌های جدید بدون اتکا به کشت باکتریایی را برای تشخیص و کنترل این باکتری‌ها را نشان می‌دهد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم آزمایشگاه‌های باکتری‌شناسی پزشکی، فرآوری محصولات شیلاتی و بیوتکنولوژی پزشکی و گروه‌های تخصصی مربوطه در دانشگاه تربیت مدرس که در انجام این پروژه مساعدت نمودند به ویژه آقای دکتر نیما خرم‌آبادی، اعلام می‌دارند. این پروژه با حمایت مالی صندوق پژوهشگران و فناوران کشور (ایران) انجام شد و نویسندگان مراتب تشکر خود را از این حمایت ها اعلام می دارند.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Saha M, Debnath C, Pramanik A. *Listeria monocytogenes*: An Emerging Food Borne Pathogen. Int J Curr Microbiol App Sci 2015; 4(11):52–72.
2. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, De Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis 2008;14(5):734-40.
3. EFSA E. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. Edited by EFSA Sro, vol EFSA Journal 2013;11(6):3241.
4. Auvolat A, Besse NG. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. Food Microbiol 2016;53(1):135–49.
5. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. J Microbiol 2005;43(1):93–100.
6. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. Front Microbiol 2014; 5(1):258. doi: 10.3389/fmicb.2014.00258.
7. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 2010;34(4):415–25.
8. Besnard V, Federighi M, Declerq E, Jugiau F, Cappelier JM. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. VetRes 2002;33(4):359–70.
9. Lindbäck T, Rottenberg ME, Roche SM, Rørvik LM. The ability to enter into an avirulent viable but non-culturable (VBNC) form is widespread among *Listeria monocytogenes* isolates from salmon, patients and environment. VetRes 2010;41(1):1–10.
10. Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria. FrontPublic Health. 2014; 2(1): 1-9.
11. Sengun IY, Karabiyikli S. Importance of acetic acid bacteria in food industry. Food Control 2011;22(5):647-56.
12. Beumer RR, Hazeleger WC. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. FEMS Immunol Med Microbiol 2003; 35(3):191–7.
13. Sue D, Boor KJ, Wiedmann M. SigmaB-dependent expression patterns of compatible solute transporter genes opuCA and lmo1421 and the conjugated bile salt hydrolase gene bsh in *Listeria monocytogenes*. Soc General Microbiol 2003;149(11):3247–56.
14. Tan Q, Xu H, Chen T, Li P, Aguilar ZP, Xu D, et al. Differential expression of virulence and stress fitness genes during interaction between *Listeria monocytogenes* and *Bifidobacterium longum*. Biosci Biotechnol Biochem 2012; 76(4):699–704.
15. Cappelier JM, Besnard V, Roche S, Garrec N, Zundel E, Velge P, et al. Avirulence of viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* cells demonstrated by in vitro and in vivo models. Vet Res 2005;36(4):589–99.
16. Su X, Chen X, Hu J, Shen C, Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. World J Microbiol Biotechnol 2013; 29(12):2213–2218.
17. Cappelier JM, Besnard V, Roche SM, Velge P, Federighi M. Avirulent viable but non culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. Vet Res 2007; 38(4):573–83.

18. Makino SI, Kii T, Asakura H, Shirahata T, Ikeda T, Takeshi K, et al. Does Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Enter the Viable but Nonculturable State in Salted Salmon Roe? ApplEnvironMicrobiol. 2000; 66(12):5536–9.

19. Asakura H, Makino S, Takagi T, Kuri A, Kurazono T, Watarai M, et al. Passage in mice causes a change in the ability of Salmonella enterica serovar Oranienburg to survive NaCl osmotic stress: resuscitation from the viable but non-culturable state. FEMS Microbiol Lett 2002; 212(1):87–93.

20. Neunlist MR, Ralazamahaleo M, Cappelier JM, Besnard V, Federighi M, Leroi F. Effect of salting and cold-smoking process on the culturability, viability, and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A. J Food Prot 2005; 68(1):85–91.

21. Gin KY-H, Goh SG. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) Enterococcus. Water Res- 2013; 47(10):3315–3328.

22. Annous BA, Becker LA, Bayles DO, Labeda DP, Wilkinson BJ. Critical role of anteiso-C15: 0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. Appl Environ Microbiol 1997;63(10):3887–94.

23. Mendum ML, Smith LT. Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. Appl Environ Microbiol 2002; 68(2):813–9.

24. Ko R, Smith LT, Smith GM. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol 1994; 176(2):426–31.

25. Beumer R, Te Giffel M, Cox L, Rombouts F, Abee T. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. Appl Environ Microbiol 1994;60(4):1359–63.

26. Nowakowska J, Oliver JD. Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state. FEMS Microbiol Ecol 2013;84(1):213–22.

27. Ozcakir O. Viable but non-culturable form of bacteria. Mikrobiyol Bul 2007;41(3):477-84.