Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Investigating the Possibility of the Listeria Monocytogenes Entering Into a Viable But Non-Culturable (VBNC) Form and Expression of the Pathogenic Genes During the Frozen Storage of (-18ºC) Rainbow Trout Fish Nugget

Sona Kalteh[1], Seyyed Mahdi Ojagh[1,2*], Alijan Tabarrayi[3], Mahdi Zolfaghari[1]

1. Department of Fishieries, Faculty of Fishieries and Environment, University of Agricultural Sciences and Natual Resources of Gorgan, Gorgan, Iran
2. Department of Fishieries, Faculty of Sea Sciences, University of Tarbiat Modarres, Noor, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

Article Information

Article Subject:
Food Microbiology

DOI: 10.30699/ijmm.13.1.69

Corresponding author:

Seyyed Mahdi Ojagh
Department of Fishieries, Faculty of Fishieries and Environment, University of Agricultural Sciences and Natual Resources of Gorgan, Gorgan, Iran

Email:
mahdi_ojagh@yahoo.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: The purpose of this study was to investigate the possibility of *Listeria monocytogenes* entering the VBNC state during the frozen storage and the expression of its pathogenic genes

Materials and Methods: Bacteria in 10^6 Colony counts of in mid log phase were inoculated into three Culture medium including Normal Saline (NS), BHI Broth and Fish Broth (FB) and kept at -18ºCfor 2 months and examined. Then, bacteria were evaluated on enriched medium BHI agar using culture methods (colony count) over times 4 and 8 hours, 2, 4, 8, 20, 30 and 60 days after the freezing shock using the method of RT-PCR for investigating the expression of *16S rRNA*, *hly* and *inlA* genes; they were evaluated before and after the freezing shock.

Results: This bacterium retained its ability to cultivate until the end of the shock, but reduced its number. Freezing stopped the expression of genes of *hly* and *inlA*, as these genes were not expressed in a rich culture medium either. By adding blood to the rich culture medium of this bacterium, only the hemolysin O pathogen gene was expressed.

Conclusion: Although freezing does not lead to the introduction of this bacterium into the VBNC state, it is effective as an adverse environmental factor for the bacteria in the expression of its pathogenic genes. Blood and its agents can act as an agent for the induction and clarification of the *hly* gene, and the expression of pathogenic bacterial genes are independent of each other.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, VBNC, *hly*, *inlA*, Freezing

Received: 2019/01/12 Accepted: 2019/05/22 Available online: 2019/06/20

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Kalteh S, Ojagh S M, Tabarrayi A, Zolfaghari M. Investigating the Possibility of the Listeria Monocytogenes Entering Into a Viable But Non-Culturable (VBNC) Form and Expression of the Pathogenic Genes During the Frozen Storage of (-18ºC) Rainbow Trout Fish Nugget. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (1) :69-79

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ - شماره ۱ - فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

بررسی امکان ورود باکتری *Listeria monocytogenes* به حالت زنده اما غیرقابل کشت و بیان ژن‌های بیماری‌زایی آن طی دورهٔ انجماد (۱۸°C-) ناگت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus Mykiss*)

صونا کلته[۱]، سید مهدی اجاق[۲،۱*]، علیجان تبرایی[۳]، مهدی ذوالفقاری[۱]

۱. گروه شیلات، دانشکدهٔ شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲. گروه شیلات، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکدهٔ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۰۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۳/۳۰

موضوع:

میکروبیولوژی مواد غذایی

IJMM1398;13(1): 69-79

نویسندهٔ مسئول:

سید مهدی اجاق

گروه شیلات، دانشکدهٔ شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک:

mahdi_ojagh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: هدف از این پژوهش بررسی امکان ورود باکتری *Listeria monocytogenes* طی فرایند انجماد به حالت Viable But Non Culturable (VBNC) و بیان ژن‌ها بیماری‌زایی آن بود.

مواد و روش کار: برای این منظور ۱۰^۶ باکتری در اواسط رشد لگاریتمی به سه محیط سرم فیزیولوژی (NS)، BHI براث و آبگوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (FB) تلقیح شد و طی ۲ ماه در دمای ۱۸°C- نگهداری و بررسی شدند. سپس باکتری‌ها با روش‌های کشت (شمارش کلنی) روی محیط BHI آگار غنی‌شده در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت، ۲، ۴، ۸، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ روز پس از شوک انجماد (۱۸°C-) و همچنین با روش RT-PCR به منظور بررسی بیان ژن‌های *16S rRNA*، *hly* و *inlA* قبل و بعد از شوک انجماد ارزیابی شدند.

یافته‌ها: این باکتری تا انتهای شوک توانایی کشت‌پذیری خود را حفظ کرد، اما از تعداد آنها کاسته شد. نتایج بررسی بیان ژن نشان داد انجماد موجب توقف بیان ژن‌های بیماری‌زای *hly* و *inlA* می‌شود. به طوری که این ژن‌ها در محیط کشت غنی نیز بیان نشدند. با افزودن خون به محیط کشت غنی این باکتری فقط ژن بیماری‌زایی همولایزین O مجدداً بیان شد.

نتیجه‌گیری: اگرچه انجماد موجب ورود این باکتری به حالت VBNC نمی‌شود، اما به عنوان یک عامل نامساعدکنندهٔ محیطی بر سطح بیان برخی از ژن‌های بیماری‌زایی باکتری مؤثر است. همچنین خون و عوامل آن می تواند به عنوان یک عامل القاکننده بیان ژن *hly* عمل کند؛ هرچند روی دیگر ژن‌های مطالعه‌شده تأثیرگذار نیست. بنابراین بیان ژن‌های بیماری‌زایی باکتری از یکدیگر مستقل است.

کلمات کلیدی: *Listeria monocytogenes*، VBNC، *hly*، *inlA*، انجماد

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

Listeria monocytogenes گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای‌شکل، بدون اسپور، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی هستند (۱). فرم بدون اسپور این باکتری به فریزکردن و خشک‌کردن مقاوم است. لیستریا می‌تواند درجه حرارت کم (۰/۴°C-) و بازهٔ گسترده‌ای از pH (۳/۶ تا ۹/۶) و همچنین فعالیت آبی (a_w) نسبتاً کم و غلظت زیاد نمک (۱۰ درصد<) را تحمل کند (۲). نگرانی رو به رشد در دهه‌های گذشته ورود *L. monocytogenes* به غذاها بوده است (۳). این پاتوژن منجر به بیماری لیستریوزیس می‌شود؛ یک بیماری نادر اما جدی، به‌ویژه برای گروه در خطر (۳) که غالباً شامل بزرگسالان دچار نقص ایمنی، افراد مسن، نوزادان تازه متولدشده و زنان باردار هستند و همراه با سقط جنین، مرده‌زایی، سپتی‌سمی و مننژیت است (۴). در سال ۲۰۰۷ در اتحادیهٔ اروپا ۰/۳ مورد در هر ۱۰۰هزار مورد با نرخ مرگ‌ومیر ۲۰ درصد ناشی از لیستریوزیس گزارش شده است (۳).

موارد متعددی از شیوع لیستریوزیس در اثر مصرف غذاهای دریایی گزارش شده است (۵). برخی از کشورها حد مجاز صفر را برای *L. monocytogenes* در ماهی‌های وارداتی در نظر گرفته‌اند. بنابراین تقاضای تولیدکنندگان محصولات دریایی برای مواد خام عاری از *L. monocytogenes* در طول فرآوری محصولات دریایی اهمیت قابل توجهی دارد (۶). *L. monocytogenes* از محصولات دریایی مثل ماهی دودی، محصولات دریایی پخته و منجمد،

ترشی ماهی و سوریمی جداسازی شده است (۷). با اینکه ۱۳ سروتیپ از سویه *L. monocytogenes* شناسایی شده‌اند، اغلب موارد انسانی شامل سروتیپ‌های 1.2a، 1.2b و 4b است (۸-۱۰) سروتیپ 4b مسئول شیوع بسیاری از موارد لیستریوزیس با منشأ غذایی است (۹).

این پاتوژن تحت شرایط استرس‌زای مختلف از جمله انکوباسیون خارج از دمای بهینهٔ رشد، شوری زیاد، افزایش فشار اسمزی، غلظت اکسیژن، نور مرئی، گرسنگی و فرایندهایی که تصور می‌شود منجر به نابودی باکتری می‌شود، وارد حالت «زنده اما غیرقابل کشت»[1] می‌شود (۱۱-۱۵). این تعریف برای حالتی است که باکتری به دلیل حفظ فعالیت متابولیکی زنده است، اما قابلیت کشت و رشد را ندارد. بنابراین کلنی‌ها را در محیط‌های اختصاصی کشت معمول توسعه نمی‌دهد (۶). به نظر می‌رسد عوامل بیماری‌زایی شامل *actA*، *hly*، *iap*، *inlA* و *plcA* نقش ویژه ای در بیماری‌زایی *L. monocytogenes* دارند (۱۶-۲۰). *hly* کدکننده لیستریولیزین O است که برای لیز حفره‌مانند و ورود به سیتوزول سلول ضروری است (۱۷). ژن *inlA* عملکرد مهمی در تهاجم باکتری با مکانیسم انتروسیتوز[2] دارد (۱۹).

از آنجایی که لیستریولایزین O (hly) عامل بیماری‌زای مهمی در *L. monocytogenes* است، بیان ژن *hly* در فاز VBNC نشان‌دهندهٔ توانایی بیماری‌زایی باکتری در این فاز VBNC است (۱۱-۲۲). در این راستا توانایی ورود *L. monocytogenes* جداشده از سالمون خام، محیط فرآوری این ماهی و بیماران مبتلا به لیستریوزیس، به فازVBNC و نیز بیماری‌زایی آن ارزیابی و بررسی شده است. این ارزیابی‌ها نشان داده است همهٔ سویه‌ها پس از گرسنگی وارد فازVBNC می‌شوند و در حضور سدیم پیروات و تغذیه با مواد غذایی جایگزین احیاء نمی‌شوند (۲۳). همچنین این مطالعات نشان داده است همزمان با از دست‌رفتن قابلیت کشت، خاصیت بیماری‌زایی نیز از دست می‌رود. همچنین عنوان شده است سویه‌های *L. monocytogenes* ممکن است در محیط آبی برای دوره‌های طولانی‌تری در فاز VBNC بمانند، اما این سلول‌ها بیماری‌زا نیستند (۲۴).

انجماد محصول فرآوری‌شده روشی مناسب برای جلوگیری از رشد *L. monocytogenes* است. هر چند *L. monocytogenes* (در صورت وجود) در محصول نهایی یا فرآوری‌شده با انجماد از بین نمی‌رود، اما رشد آن طی دورهٔ انجماد متوقف خواهد شد. انجماد و ذخیرهٔ طولانی مدت به شکل منجمد می‌تواند تأثیراتی منفی روی خواص محصول بگذارد. همچنین، با وجود نگهداری محصول فرآوری‌شده در فریزر به صورت طولانی مدت، انجمادزدایی می‌تواند منجر به رشد *L. monocytogenes* در محصول فرآوری‌شده شود (۲۵). پس از انجماد گونه‌های مختلف، انواع متفاوتی از بقا را در ارتباط با اندازهٔ سلول و شکل و ساختار آن نشان داده‌اند. باکتری‌هایی با اندازه بزرگ‌تر و پیچیدگی بیشتر در مقابل آسیب‌های انجماد نسبت به انواع کوچک‌تر و ساده‌تر مقاومت کمتری دارند (۲۶، ۲۷).

توانایی ورود *L. monocytogenes* به فاز VBNC طی استرس‌های حین فرآوری نگران‌کننده است؛ به دلیل آنکه آزمون‌های باکتریولوژیکی کشت معمول، موفق به شناسایی ارگانیسم‌های غیرقابل کشت در محصول و محیط فرآوری نشده و ریسک خطر مصرف لیستریا مونوسیتوژنز در فاز VBNC هنوز ناشناخته است. یکی از این استرس‌ها انجماد است. به همین دلیل هدف از این مطالعه بررسی امکان ورود *L. monocytogenes* به حالت VBNC طی انجماد ۱۸ºC- با استفاده از بررسی بیان ژن *16S rRNA* و بررسی بیماری‌زایی آن با استفاده از ژن‌های *hly* و *inlA* است.

مواد و روش‌ها

باکتری *L. monocytogenes* سویه استاندارد ATCC 19115 (سروتیپ 4b)، از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران در سال ۱۳۹۷ به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری‌ها در محیط BHI براث به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ºC انکوبه شدند. سپس روی محیط BHI آگار کشت شدند و ۲۴ ساعت در ۳۷ºC انکوبه و یک کلونی خالص از آن برای ادامه مطالعات استفاده شد.

محیط‌های بررسی‌شده

امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC در دمای انجماد ۱۸ºC- در سه محیط سرم فیزیولوژی Normal saline(NS) (به عنوان شرایط نبود مواد تغذیه‌ای و ماتریکس محافظت‌کننده) BHI براث (شرایط محیط تغذیه‌ای غنی) و آبگوشت ماهی یا Fish Broth (FB) (شرایط ماتریکس گوشت ماهی) قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی شد. محیط BHI براث طبق برنامه شرکت مربوطه آماده سازی و اتوکلاو شد.

[1] . Viable But Non Culturable (VBNC)
[2] . Enterocitos

آماده‌سازی محیط آبگوشت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (FB)

عصارهٔ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به روش Nilsson و همکاران (۱۹۹۹) آماده شد. در این روش ابتدا ماهی قزل‌آلا تمیز (پوست‌کنی و تخلیه امعا و احشا) و چرخ شد. در ادامه با آب مقطر به نسبت ۱:۲ (وزنی/حجمی) به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و به مدت ۱۰ دقیقه فیلتر شد. عصاره حاصل با افزودن ۵/۹۸ گرم در لیتر KH_2PO_4 و ۹/۷۵ گرم در لیتر K_2HPO_4 بافری و pH آن با استفاده از HCl ۱ مولار در ۶/۲ ثابت شد. عصاره تهیه‌شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱°C استریل و تا ۲۴ ساعت پیش از تلقیح در دمای ۴°C نگهداری شد (۲۸).

آماده‌سازی باکتری‌ها به منظور تلقیح به محیط‌های کشت

یک کلونی خالص به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براث استریل منتقل شد و در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۲۰۰ انکوبه شد (۲۹). باکتری‌ها در جذب حدود ۰/۴ (OD_{600}) معادل تقریباً 10^9 باکتری در هر میلی لیتر بودند. در این میزان جذب باکتری‌ها تقریباً در اوایل تا اواسط مرحله رشد لگاریتمی است.

تلقیح باکتری‌ها به محیط‌های کشت

بدین منظور از باکتری‌ها در جذب ۰/۴ با تعداد 10^9 باکتری در هر میلی لیتر استفاده شد. برای تهیه پلیت باکتری، محلول باکتریایی با دور rpm ۷۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. قبل از تلقیح به محیط‌های کشت مدنظر، با سه مرحله رقیق سازی ۱/۱۰، تعداد باکتری‌ها به 10^6 در هر میلی‌لیتر رسید. برای این منظور ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی باکتری به ۱۸۰۰ میکرولیتر محیط‌های NS، BHI براث و FB تلقیح شد. پس از تلقیح، از تیمار ۳ نمونه به طور تصادفی برای تعیین تعداد اولیهٔ باکتری روی محیط BHI آگار کشت داده شد.

شوک انجماد نمونه‌ها

هر تیمار با سه تکرار به ترتیب ۴ و ۸ ساعت و ۲، ۴، ۸، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ روز پس از قرارگیری نمونه‌ها در فریزر ۱۸°C- تا رسیدن زمان موعد کلنی کانت و استخراج، قرار داده شدند.

شمارش کلنی

در انتهای زمان فریزکردن نمونه‌ها، به منظور بررسی تعداد باکتری‌های کشت‌پذیر روی محیط BHI آگار غنی‌شده با ۲ درصد عصاره مخمر و ۰/۵ درصد سدیم پیروات، شمارش کلنی انجام شد. در تمامی زمان‌های فوق شمارش کلنی هر سه محیط پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت بررسی و شمارش شد.

بررسی بیان ژن

بدین منظور ژن *16S rRNA* به عنوان ژن خانه‌گردان (Houskeeping gene) همچنین ژن‌های *hly* و *inlA* به عنوان ژن‌های بیماری‌زایی این باکتری (۳۰) برای مقایسه در دو محیط BHI و FB بررسی شدند. بررسی بیان این ژن‌ها یک‌بار قبل از شوک و بار دیگر بعد از شوک انجماد طی روزهای ۲ و ۲۰ به منظور مقایسه بیان آنها انجام شد. برای بررسی بیان ژن به ترتیب زیر مراحل انجام شد:

استخراج RNA باکتری

بدین منظور از کیت استخراج شرکت سیناکلون، ایران استفاده شد که مراحل آن طبق برنامه به شرح زیر است:

۱. تهیه رسوب باکتری (۱۰۰۰۰ rpm-۲ min)؛ ۲. افزودن ۴۰ µl آنزیم لیزوزیم ۰/۴ mg (۳۷°C /۲۰ min)؛ ۳. افزودن ۴۰۰ µl محلول لیز لایزیز بافر انکوبه‌شده؛ ۴. افزودن ۳۰۰ µl از محلول precipitation؛ ۵. انتقال به ستون استخراج RNA (۱۳۰۰۰ rpm-۱ min)؛ ۶. افزودن ۴۰۰ µl محلول شست‌وشوی اول (۱۳۰۰۰ rpm-۱ min)؛ ۷. افزودن ۴۰۰ µl محلول شست‌وشوی دوم به تعداد ۲ بار (۱۳۰۰۰ rpm-۱ min)؛ ۸. رفع اتانول احتمالی باقی‌مانده (۱۳۰۰۰ rpm-۲ min)؛ ۹. انتقال ستون‌ها به میکروتیوب جدید ۱/۵ ml؛ ۱۰. افزودن ۳۰ µl از محلول RNase free water انکوبه‌شده در دمای ۵۵°C به ستون‌ها (۱۳۰۰۰ rpm-۱ min) دو بار. RNA حاصل تا زمان استفاده در ۷۰°C- نگهداری شد.

برای حذف DNA ناشی از آلودگی با استفاده از کیت DNase شرکت Genet Bio به شرح زیر استفاده شد:

به ازای هر ۱ µg RNA ۱ µl مقدار ۱ بافر $MgCl_2$ و ۱ µl آنزیم DNase افزوده و مخلوط در۳۷°C به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در انتها مقدار ۱ µl EDTA به میکروتیوب افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در۶۵°C به منظور توقف فعالیت آنزیم DNase انکوبه شد. RNA حاصل به منظور استفاده در RT PCR و سنتز cDNA استفاده شد.

سنتز cDNA

به منظور سنتز cDNA از کیت ABI استفاده شد. بدین منظور مستر ساخت cDNA با حجم ۱۰ µl که شامل موارد زیر است ساخته شد: RT Buffer(2 µl)، dntp(0.8 µl)، Random Primer(2 µl)، RT(1)، DW(4.2 µl). درنهایت با ۱۰ µl از RNA ترکیب شدند. برنامه دمایی ساخت cDNA به شرح زیر بود: ۱. ۲۵°C، ۱۰ دقیقه؛ ۲. ۳۷°C، ۱۲۰ دقیقه؛ ۳. ۸۵°C، ۵ دقیقه.

cDNA سنتزشده به منظور انجام فرایند PCR استفاده شد.

فرایند PCR

به منظور انجام عملیات PCR از کیت Prim Taq Premix (2X) شرکت Genet Bio با دستور تهیه مستر میکس به صورت زیر استفاده شد: Buffer (2.5 µl)، $Mgcl_2$ (2 µl)، dntp (0.5 µl)، Taq (0.2 µl)، Primer Forward (0.5 µl (10 pm))، Primer Riverse (0.5 µl (10 pm))، DW (12.8 µl). میزان نمونه cDNA ۱µl بود. مخلوط به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ جزئی شد تا قطراتی که روی جداره میکروتیوپ بود، حذف شود. سپس در دستگاه PCR با تنظیمات دمایی زیر قرار داده شد:

۱. واسرشت اولیه ۵ دقیقه در ۹۵°C؛ ۲. تکثیر DNA به تعداد ۳۷ چرخه: الف) واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۴ °C، ب) اتصال پرایمر: ۴۰ ثانیه در ۶۰°C، ج) گسترش: ۴۰ ثانیه در ۷۲°C؛ ۳. باز سرشت نهایی ۵ دقیقه در ۷۲°C.

الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل ۲-۱/۵ درصد آگارز صورت پذیرفت و سپس از ژل با استفاده از دستگاه ژل داک عکس‌برداری شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول یک درج شده است.

کشت در محیط بلاد آگار

به منظور احیای احتمالی باکتری‌ها، در انتهای دورهٔ انجماد از محیط آبگوشت ماهی بر روی محیط بلاد آگار کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه و همولیز بتای آن بررسی شد. سپس بیان هر سه ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* بررسی شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. نتایج داده‌های پارامتریک با روش‌های ANOVA ارزیابی شد و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون LSD صورت پذیرفت. برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های نرمال از آزمون دانکن و برای داده‌های غیرنرمال از آزمون من ویتنی استفاده شد. در مواقع لزوم از آزمون ناپارامتریک کای اسکوور برای تجزیه و تحلیل داده‌های ناپارامتریک استفاده شد. تمام تجزیه و تحلیل‌ها در سطح اطمینان ۵ درصد و با نرم افزار SPSS صورت پذیرفت. نتایج به دست‌آمده با ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل انجام شد.

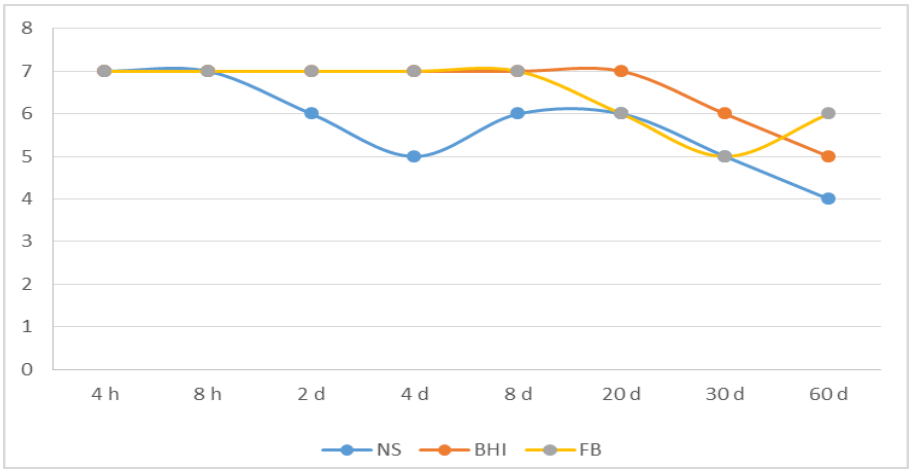
جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده‌شده در پژوهش (۳۱-۳۳)

نام ژن	توالی الیگونوکلئوتید	دمای اتصال (°C)	اندازه محصول (bp)
16S rRNA	F: TTA GCT AGT TGG TAG GGT R: AAT CCG GAC AAC GCT TGC	۶۰	**۱۰۹**
hly	F: CGCAACAAACTGAAGCAAAGG R: TTGGCGGCACATTTGTCAC	۶۰	**۱۳۹**
inlA	F: CGGATGCAGGAGAAAATCC R: CTTTCACACTATCCTCTCC	۶۰	**۹۵**

یافته‌ها

بررسی نتایج شمارش کلنی باکتری‌ها در محیط BHI آگار غنی‌شده

نتایج بررسی شمارش کلنی در محیط BHI آگار غنی‌شده در هر سه تیمار NS، BHI براث، FB طی زمان‌های ۴ و ۸ ساعت و ۲، ۴، ۸، ۲۰، ۳۰ و ۶۰ روز پس از قرارگیری نمونه‌ها در فریزر، نشان داد این باکتری در شوک دمایی ۱۸°C- قابلیت رشد روی محیط کشت غنی‌شده BHI آگار را حفظ کرده است، اما تعداد آنها طی این زمان با کاهش همراه بود (شکل ۱).



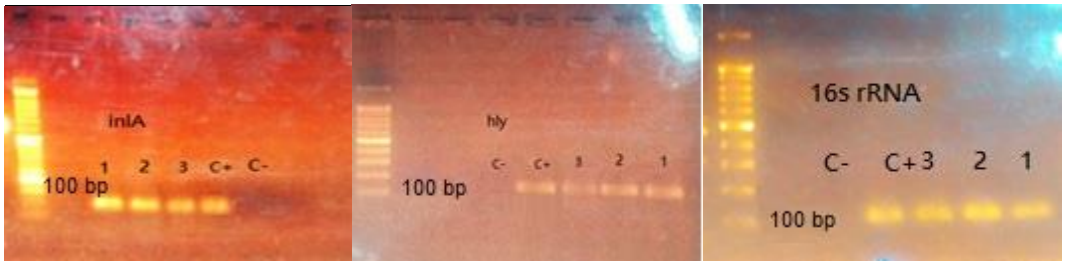
شکل ۱. نتایج روند کلنی کانت باکتری *L.monocytogenes* در دمای ۱۸ºC- در تیمارهای BHI (BHI Broth) و FB (Fish Broth)
محور افقی: مدت زمان سپری‌شده (دو زمان اول ۴ ساعت و ۸ ساعت پس از شوک مربوط به روز اول و زمان‌های بعدی در روزهای بعدی)؛ محور عمودی: لگاریتم تعداد باکتری

نتایج بررسی بیان ژن

بررسی نتایج شمارش کلنی باکتری‌ها در محیط BHI آگار غنی شده

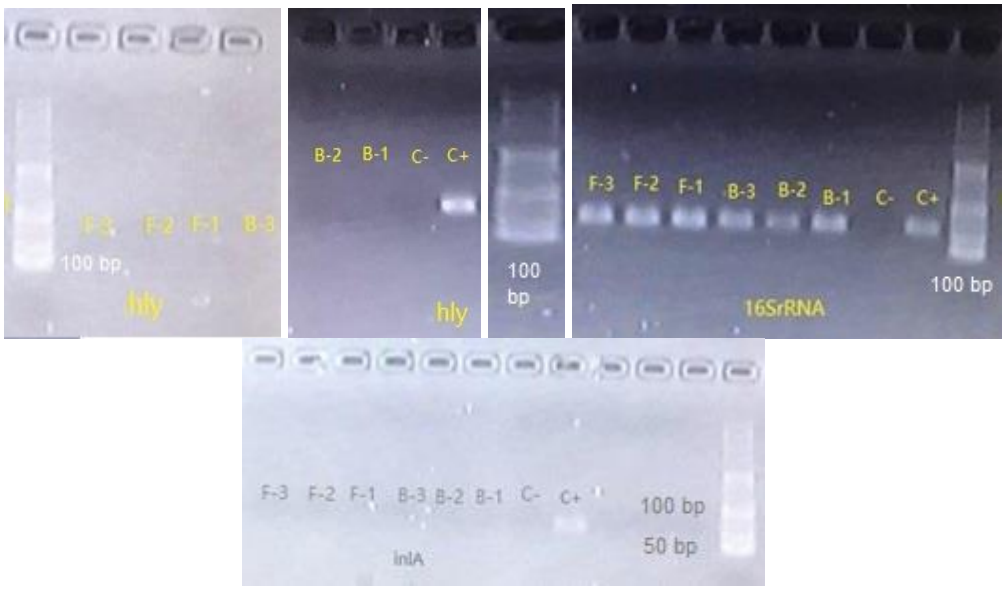
نتایج بررسی بیان ژن‌های *16s rRNA*، *hly* و *inlA* قبل از شوک انجماد نشان‌دهندهٔ بیان هر سه ژن و داشتن خاصیت بیماری‌زایی این باکتری بود (شکل ۲).

نتایج الکتروفورز محصول PCR باکتری‌ها پس از شوک انجماد برای روز دوم استخراج نشان‌دهندهٔ بیان ژن *16S rRNA* در هر دو تیمار BHI براث و FB بود. طبق این نتایج باکتری *L. monocytogenes* در دمای ۱۸ºC- به مدت ۲۰ دقیقه قادر به زنده ماندن است و ژن خانه‌گردان خود را نیز بیان می‌کند. همچنین شاهد بیان ژن *hly* به ترتیب در تکرارهای دوم و اول محیط‌های BHI و FB بودیم. ژن *inlA* در هیچ‌کدام از تیمارها بیان نشد (شکل ۳).



شکل ۲. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرایند بررسی بیان ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* قبل از شوک انجماد
ترتیب و تکرار تیمارها برای هر دو محیط به ترتیب ۱، ۲ و ۳؛ کنترل مثبت (C^+) شامل DNA لیستریا مونوسیتوژنز؛ کنترل منفی (C^-) شامل نمونهٔ بدون الگو

شکل ۳. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرایند بررسی بیان ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* در تیمارهای BHI (BHI Broth) و FB (Fish Broth) در روز دوم انجماد ترتیب و تکرار تیمارها برای هر دو محیط به ترتیب ۱، ۲ و ۳؛ کنترل مثبت (C^+) شامل DNA لیستریا مونوسیتوژنز؛ کنترل منفی (C^-) شامل نمونهٔ بدون الگو



شکل ۴. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرایند بررسی بیان ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* در تیمارهای BHI (BHI Broth) و FB (Fish Broth) در روز بیستم انجماد ترتیب و تکرار تیمارها برای هر سه محیط به ترتیب ۱، ۲ و ۳؛ کنترل مثبت (C^+) شامل DNA لیستریا مونوسیتوژنز؛ کنترل منفی (C^-) شامل نمونه بدون نمونه

نتایج الکتروفورز برای روز بیستم استخراج نشان‌دهندهٔ بیان ژن *16S rRNA* در هر دو تیمار BHI براث و FB بود. ژن *hly* و *ilnA* در هیچ‌کدام از تیمارها بیان نشد (شکل ۴).

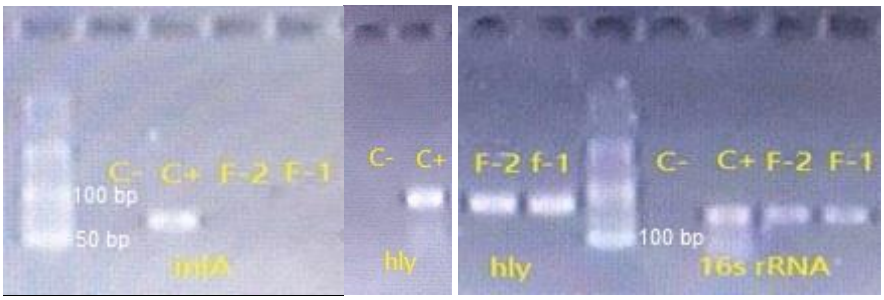
از مقایسه نتایج بررسی بیان ژن با نتایج شمارش کلنی در محیط کشت غنی‌شده BHI آگار، می‌توان به این نتیجه رسید باکتری موجود در هر سه محیط طی شوک انجماد زنده است و خاصیت بیماری‌زایی خود را از طریق بیان ژن *hly* در دو محیط شرایط مغذی (BHI ,FB) در روز دوم حفظ کرده است. از آنجا که در شمارش باکتری‌ها در محیط کشت غنی شاهد رشد باکتری‌ها بودیم، می‌توان نتیجه گرفت باکتری وارد فاز VBNC نشده است، اما بر اثر شوک دمایی وارده ضعیف شده است.

نتیجه بررسی کشت در بلاد آگار در انتهای دورهٔ انجماد

نتایج نشان‌دهندهٔ رشد باکتری تلقیح‌شده از محیط FB در روز شصتم و همولیز مثبت آن در محیط آگار خون‌دار بود.

نتایج بررسی بیان ژن محیط FB در محیط بلاد آگار

نتایج نشان‌دهندهٔ بیان ژن *16S rRNA* و بیان مجدد ژن *hly* بود. در مورد ژن *inlA* هیچ‌گونه بیانی مشاهده نشد (شکل ۵).



شکل ۵. نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرایند بررسی بیان ژن *16s rRNA*، *hly* و *inlA* در تیمار FB (Fish Broth) در روز شصتم انجماد، پس از احیا در محیط کشت بلاد آگار ترتیب و تکرار تیمارها برای هر دو محیط به ترتیب ۱، ۲ و ۳؛ کنترل مثبت (C^+) شامل DNA لیستریا مونوسیتوژنز؛ کنترل منفی (C^-) شامل نمونه بدون نمونه

بحث و نتیجه‌گیری

L. monocytogenes به‌خوبی در شرایط انجماد زنده می ماند و نگهداری به صورت منجمد باعث ثابت ماندن تقریبی جمعیت زندهٔ باکتری می‌شود (۳۴). در پژوهش حاضر باکتری *L. monocytogenes* به انجماد مقاوم بود و با حفظ کشت‌پذیری‌اش تا انتهای دورهٔ انجماد قادر به زنده ماندن بود. مطالعات نشان داده است *L. monocytogenes* می‌تواند در گوشت گوسفند در دمای ۲۳°C- به مدت ۲۰ روز، در ۲۰°C- به مدت ۲ سال با ۳۵ بار انجمادزدایی و در کره در دمای ۱۸°C- به مدت ۷۰ روز زنده بماند (۳۵). همچنین در مطالعه‌ای دیگری بررسی وجود و بقای *L. monocytogenes* نشان داده است از میان ۴۷۰ نمونه ماهی خام، محصولات ماهی و محصولات دریایی دیگر، ۱/۹۲ درصد از آنها به *L. monocytogenes* آلوده بودند؛ به این صورت که از بین ۴۵ نمونه ماهی هیک منجمد یک مورد (۲/۲۲ درصد)، از بین ۶۱ نمونه محصول دریایی منجمد ۲ مورد و ۴ مورد محصول ماهی منجمد، به باکتری آلوده بودند. آنها همچنین اشاره داشتند این باکتری می‌تواند ماهیان دریاهای گرمسیری را آلوده کند که از جمله محصولات آلوده‌شده از این طریق می‌توان به آلودگی ۱۷/۲ درصد صدف منجمد و ۱۲/۱ درصد شل فیش‌های[۳] خوراکی منجمد اشاره کرد.

L. monocytogenes به عنوان جنس عفونت‌زای گونهٔ *Listeria* در دومین ردهٔ دفعات جداسازی از نمونه‌ها قرار دارد که این مسئله نگران‌کننده است (۳۶). طبق مطالعات باکتری *L. monocytogenes* به فریز کردن مقاوم است. طبیعت سرمادوست این باکتری همراه با کاهش طول زنجیره اسید چرب است (۲). بقای باکتری در طول دورهٔ انجماد به طور معمول به چندین عامل بستگی دارد، که شامل طبیعت سلول (۳۷، ۳۸)، ترکیب محافظ‌های سرمایی (۳۷، ۳۹) و شرایط انجماد-انجمادزدایی (۳۷، ۴۰) است. بقا پس از گرسنگی با فراهم‌سازی انرژی درونی از طریق مواد ذخیره‌ای، RNA و پروتئین‌هایی که فرایندهای سلولی را حفظ می‌کنند اتفاق می‌افتد. انجماد و انجمادزدایی لیستریا منجر به آسیب دیوارهٔ سلولی و غشای پلاسمایی می‌شود که ناشی از تشکیل کریستال‌های داخل و خارج سلولی می‌شود (۲). دمای انجمادزدایی ممکن است از طریق تغییرات غلظت الکترولیت یا کریستاله‌شدن مجدد در طول انجمادزدایی به شکل جدی بر بقای باکتری تأثیر بگذارد (۴۱-۴۳).

در تحقیق حاضر تعداد باکتری‌ها ثابت نماند و نتایج کلنی کانت و نمودار رشد باکتری نشان داد تعداد آنها تا انتهای دورهٔ انجماد کاهش یافته و از 10^7 cfu/g به 10^5 cfu/g رسیده است. سلول‌های باکتریایی همچنان قابل کشت بود. در راستای نتایج ما هریسون و همکاران (۱۹۹۱) مشاهده کردند تعداد سلول‌های *L. monocytogenes* تلقیح‌شده به ماهی و میگو پس از انجماد در دمای ۲۰ °C- به مدت سه ماه، به اندازه ۳ log کاهش می‌یابد (۴۴). طبق مطالعات، pH کم محیط‌های منجمد، مرگ و صدمه سلول‌های *L. monocytogenes* را طی نگهداری منجمد افزایش می‌دهد (۴۵). از این‌رو یکی از عوامل کاهش تعداد باکتری‌ها در این تحقیق را می‌توان در pH محیط جست‌وجو کرد. همچنین کاهش تعداد باکتری‌ها را می‌توان یا به دلیل آسیب سلولی و مرگ آن عنوان کرد، هرچند که احتمال آن کم است چون انجماد منجر به مرگ باکتری نمی‌شود، و یا به دلیل ورود به حالت VBNC. زمان بیشتری برای بررسی نتایج کلنی کانت لازم بود تا مشخص شود باکتری‌ها وارد حالت VBNC می‌شوند یا نه.

انواع مختلفی از باکتری‌ها می‌توانند در دمای کم محیطی وارد حالت VBNC شوند؛ مانند ویبریو (۲۱)، آئرومونـاس (۴۶)، یرسینیا (۴۷)، سالمونلا (۴۸) و اخیرا لیستریا (۴۹). در پژوهش حاضر باکتری *L. monocytogenes* تا انتهای دورهٔ انجماد در هر دو محیط وارد حالت VBNC نشد. در این زمینه تحقیقات بسیار کمی انجام شده است؛ از جمله آنها پژوهش Zeng و همکاران (۲۰۱۳) است که نشان داد باکتری *Salmonella typhi* پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۰°C- در شرایط گرسنگی وارد حالت VBNC می‌شود و پس از احیا، در موش خاصیت بیماری زایی خواهد داشت (۴۸).

همچنین بررسی بیان ژن‌های بیماری‌زایی *hly* و *inlA* نشان داد بیان ژن *hly* با افزایش زمان متوقف می‌شود. درنتیجه باکتری تا انتهای دورهٔ انجماد قادر به حفظ خاصیت بیماری‌زایی‌اش نبود. دما برای بیان ژن‌های اصلی بیماری‌زایی در *L. monocytogenes* مهم است (۵۰). در این ارتباط Duodu و همکاران (۲۰۱۰) عنوان کرده‌اند بیان ژن‌های بیماری‌زای *L. monocytogenes* زمانی که فیله ماهی سالمون در دماهای مختلف نگهداری شود، به صورت متفاوتی بیان می‌شود. بیان ژن‌های *hly* و *ilnA* در دمای ۲۰°C بیش از دماهای ۰ و ۴°C است (۵۱). درنتیجه می‌توان عنوان کرد در دمای کم، بیان ژن‌ها کاهش می‌یابد که دلیل آن می‌تواند نرخ متابولیکی کم باکتری در دماهای کم باشد.

همان‌طور که در نتایج عنوان شده است، به منظور احیای

[۳]. Shel fishes

احتمالی باکتری‌های صدمه‌دیده یا آنهایی که احتمالاً وارد حالت VBNC شده‌اند، در ماتریکس گوشت ماهی از محیط غنی‌شده حاوی سدیم پیروات و مخمر استفاده شد. مطالعه حاضر نشان داد ژن‌های *hly* و *inlA* در باکتری‌های رشدیافته بیان نمی‌شوند یا اصطلاحاً خاموش بودند، اما زمانی که خون به محیط کشت باکتری‌ها افزوده شد، ژن *hly* که مسئول همولیز سلول‌هاست مجدداً روشن شد و همولیز بتای باکتری نیز در محیط کشت مثبت شد، در صورتی که ژن *inlA* همچنان خاموش ماند. این موضوع نشان می‌دهد خون حاوی عواملی است که می‌تواند روشن شدن ژن بیماری‌زای *hly* را در این باکتری القا کند. اولین گزارش در مورد احیای سلول‌های VBNC پس از تیمار سلول‌های *سالمونلا تیفی* با مواد مغذی (تزریق BHI) مشاهده شد. طبق این گزارش پس از ۴ روز از ورود سلول‌ها به حالت VBNC، احیا اتفاق افتاد (۵۲).

در ارتباط با بیان ژن *hly* Bunic و همکاران (۱۹۹۶) مشخص کرده‌اند فعالیت لیستریولیزین O پس از چندین هفته ماندن باکتری *L. monocytogenes* در دمای کم از دست می‌رود و خاصیت بیماری‌زایی آن پس از ۲۴ ساعت انکوبه در دمای ۳۷°C بازمی‌گردد (۵۳) که دلیل آن را می‌توان به پروتئین *PrfA* که تنظیم‌کننده بیان ژن‌های بیماری‌زای *hly*، *inlA* و *actA* است، نسبت داد که به دما وابسته است و در دمای زیر ۳۰°C بیان نمی‌شود (۵۳). بیان این ژن‌ها توسط Sigma-B نیز کنترل می‌شود که بیان این ژن ممکن است استرس‌های فیزیولوژیکال در میکروارگانیسم را بهبود بخشد (۵۳ -۵۵)، همچنین فعالیت Sigma-B به مرحلهٔ رشد باکتری بستگی دارد که حداکثر فعالیت آن در فاز سکون باکتری است (۵۶، ۵۷). pH بهینه لیستریولیزین O ۵/۵ است و در pH: ۷ غیرفعال بود. فعالیت آنها دوباره با کاهش pH به ۵/۵ احیا شد (۵۸). عدم بیان ژن *inlA* را می‌توان در دسترس‌نبودن شرایط مغذی مورد نیاز برای روشن شدن آن بیان کرد.

مطالعات در ارتباط با باکتری‌هایی که تحت تنش‌های مختلف فرآوری محصولات آماده مصرف قرار می‌گیرند و ممکن است تحت این شرایط وارد حالت VBNC شوند، نقش مهمی در برنامه‌ریزی سلامت انسان‌ها و حیوانات به عهده دارد. به دلیل اینکه این سلول‌ها ممکن است با یا بدون ورود به حالت VBNC خاصیت بیماری‌زایی خود را حفظ کنند و با مصرف محصول آمادهٔ مصرف، منجر به بیماری در مصرف‌کننده شوند و یا اینکه بیان ژن‌های بیماری‌زا در بدن مصرف‌کننده از سر گرفته شود و منجر به مسمومیت یا مرگ مصرف‌کننده شود. درک بیشتر سلول های VBNC ممکن است به ما در توضیح اینکه چرا شمار باکتریایی در زمستان کاهش می‌یابد، کمک کند.

در تحقیق حاضر مشاهده شد که طی دورهٔ انجماد از تعداد باکتری‌های اولیه کاسته شد و بیان ژن خانه‌گردان *16S rRNA* تا انتهای دوره ادامه داشت، اما با گذشت زمان بیان ژن‌های بیماری‌زا متوقف شد، در عین حال خاصیت بیماری‌زایی با کشت در محیط بلاد آگار مجددا حاصل شد. همچنین ممکن است باکتری با ورود به بدن و قرارگرفتن در معرض شرایط مناسب رشدی، مجدداً خاصیت بیماری‌زایی‌اش را به دست آورد و موجب مسمومیت و مرگ مصرف‌کننده شود. این موضوع می‌تواند هشداری جدی برای تولیدکنندگان محصولات منجمد در ارتباط با بیماری‌زایی این پاتوژن برای مصرف‌کننده باشد. بنابراین بازبینی فرایند فرآوری محصولات شیلاتی و اخذ فرایندهای فرآوری بهتر قبل از مصرف توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

از تمام کسانی که ما را در انجام این پژوهش یاری کردند، به‌ویژه مسئولان محترم آزمایشگاه‌های گروه میکروبیولوژی دانشکدهٔ پزشکی و گروه بیوتکنولوژی دانشگاه علوم پزشکی گلستان کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

References

1. Weller D, Andrus A, Wiedmann M, den Bakker HC. *Listeria Booriae* sp. *nov*. and *Listeria Newyorkensis* sp. nov., From Food Processing Environments in the USA. Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65(1):286-292.
2. Foong ChS. The Ecology of Listeria Monocytogenes in Ready-to-Eat (RTE) Meat [PhD. Dissertation]. Ames, Iowa: Iowa State University; 2003.
3. Anonymous, The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. The EFSA Journal. 2009; 223(7):136-158.
4. Besnard V, Federighi M, Declerq E, Jugiao F, Cappelier JM. Environmental and Physico-Chemical Factors Induce VBNC State in Listeria Monocytogenes. INRA, EDP Sciences. 2002; 33(4):359-370.
5. Farber JM, Daley EM, MacKie MT, Limerick B. A Small Outbreak of Listeriosis Potentially Linked to the Consumption of Imitation Crab Meat. Lett Appl Microbiol.

2000; 31(2):100-104.

6. Oliver JD. The Public Health Significance of vViable but Nonculturable Bacteria. In: Colwell RR, Grimes DJ (Eds.), Nonculturable Microorganisms in the Environment. Berlin: Springer Science & Business Media; 2000.

7. Dillon RA, Patel TR. *Listeria* in Seafoods: A Review. J Food Prot. 1992; 55(12):1009-1015.

8. Kathariou S. *Listeria Monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, A Food Safety Perspective. J Food Prot. 2002; 65(11):1811-1829.

9. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The Epidemiology of Human Listeriosis. Microbes Infect. 2007; 9(10):1236-1243.

10. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. Methods for the Isolation and Identification of *Listeria* spp. and *Listeria Monocytogenes*: A Review. FEMS Microbiol. 2005; 29(5):851-875.

11. Oliver JD, Bockian R. In Vivo Resuscitation, and Virulence Towards Mice, of Viable but Nonculturable Cells of *Vibrio Vulnificus*. Appl Environ Microbiol. 1995; 61(7):2620-2623.

12. Oliver JD. The Viable but Non Culturable State in Bacteria. J Microbiol. 2005; 43:93-100.

13. Rice SA, McDougald D, Kjelleberg S. *Vibrio Vulnificus*: A Physiological and Genetic Approach to the Viable but Nonculturable Response. JIC. 2000; 6(2):115- 120.

14. Grey B, Steck TR. Concentrations of Copper Thought To Be Toxic to *Escherichia coli* Can Induce the Viable but Nonculturable Condition. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(11):5325-5327.

15. Kong IS, Bates TC, Hülsmann A, Hassan H, Smith BE, Oliver JD. Role of Catalase and oxyR in the Viable but Nonculturable State of *Vibrio Vulnificus*. FEMS Microbiol Ecol. 2004; 50(3):133-142.

16. Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Vega Y, Chico-Calero I, Vazquez-Boland J. A Rol for ActA in Epithelial Cell Invasion by *Listeria Monocytogenes*. Cell Microbiol. 2001; 3:853-864.

17. Moors MA, Levitt B, Youngman P, Portnoy DA. Expression of Listeriolysin O and *ActA* by Intracellular and Extracellular *Listeria Monocytogenes*. Infect Immun. 1999; 67(1):131-139.

18. Wuenscher MD, Kohler S, Bubert A, Gerike U, Goebel W. The *iap* Gene of Listeria Monocytogenes is Essential for Cell Viability, and Its Gene Product, P60, has Bacteriolytic Activity. J Bacteriol. 1993; 175(11):3491-3501.

19. Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P. Internalins: A Complex Family of Leucine-Rich Repeat-Containing Proteins in Listeria Monocytogenes. Microbes Infect. 2007; 9(10):1156-1166.

20. Camilli A, Tilney LG, Portnoy DA. Dual Roles of Plca in Listeria Monocytogenes Pathogenesis. Mol Microbiol. 1993; 8(1):143-157.

21. Mizunoe Y, Wai SN, Ishikawa T, Takade A, Yoshida S. Resuscitation of Viable but Nonculturable Cells of Vibrio Parahaemolyticus Induced at Low Temperature Under Starvation. FEMS Microbiol Lett. 2000; 186(1):115-120.

22. Oliver JD, Hite D, McDougald D, Andon NL, Simpson LM. Entry Into, and Resuscitation From, the Viable but Nonculturable State be Vibrio Vulnificus in an Estuarine Environment. Appl Environ Microbiol. 1995; 61(7):2624-2630.

23. Lindback T, Rottenberg ME, Roche SM, Rorvik 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. Vet Res. 2010; 41(1):8.

24. 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. *EDP Sciences*. 2005; 36(4):589-599.

25. Jahncke ML, Collette RP, Hicks DT, Wiedmann M, Scott VN, Gall K. Treatment Options to Eliminate or Control Growth of *Listeria Monocytogenes* on Raw Material and on Finished Product for the Smoked Fish Industry. Food Protection Trends. 2004; 24(8):*612-619.*

26. Bozoglu TF, Ozilgen M, Bakir U. Survival Kinetics of Lactic Acid Starter Cultures During and After Freeze Drying. Enzyme and Microbial Technology. 1987; 9:531-537.

27. Klaenhammer TR, Kleeman EG. Growth Characteristics, Bile Sensitivity, and Freeze Damage in Colonial Variants Of Lactobacillus Acidophilus. Appl Environ Microbiol. 1981; 41(6):1461-1467.

28. Nilsson L, Gram L, Huss HH. Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold Smoked Salmon Using a Competitive Lactic Acid Bacteria. Flora J Food Prot. 1999; 62(4):336-342.

29. Seu D, Boor KJ, Wiedmann M. sigB-Dependent Expression Patterns of Compatible Solute Transporter Genes opuCA and lmo1421 and the Conjugated Bile Salt Hydrolase Gene bsh in *Listeria Monocytogenes*. Microbiology. 2003; 149(11):3247-3256.

30. Tan Q, Xu H, Chen T, Li P, Aguilar ZP, Xu D, Ming X, Xu F, Wei H. Differential Expression of Virulence and Stress Fitness Genes During Interaction Between Listeria Monocytogenes and Bifidobacterium Longum. Biosci Biotechnol Biochem. 2012; 76(4):699-704.

31. Tasara T, Stephan R. Evaluation of Housekeeping Genes in *Listeria Monocytogenes* as Potential Internal Control References for Normalizing mRNA Expression Levels in Stress Adaptation Models Using Real-Time PCR. FEMS Microbiol Lett. 2007; 269(2):265-272.

32. Park YS, Lee SR, Kim YG. Detection of Escherichia coliO157:H7, *Salmonella spp*., *Staphylococcus Aureus* and *Listeria Monocytogenes*in Kimchi by Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). J Microbiol. 2006; 44(1):92-7.

33. Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, et al. Anew Perspectiveon *Listeria Monocytogenes* Evolution. PloS Pathogens. 2008; 4(9):e1000146.

34. Lou Y, Yousef AE. Characteristics of *Listeria Monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser ET, Marth EH (eds.), *Listeria*, Listeriosis and Food Safety; 2 ed. New York: Marcel Dekker; 1999.

35. Uuchs RS. *Listeria Monocytogenes*. ASEAN Food J. 1992; 6:3-13.

36. Kuzmanović J, Ašanin R, Baltić M, Mišić D, Dimitrijević M, Stojanović M, et al. Presence of *Listeria* SPP in Fish Samples, Fish Product and Sea Products. Acta Veterinaria (Beograd). 2011; 61(2-3):193-203.

37. Fonseca F, Béal C, Corrieu G. Operating Conditions That Affect the Resistance of Lactic Acid Bacteria to Freezing and Frozen Storage. Cryobiology. 2001; 43(3):189-198.

38. O'Brien KV, Aryana KJ, Prinyawiwatkul W, Ordonez KMC, Boeneke CA. The Effects of Frozen Storage on the Survival of Probiotic Microorganisms Found in Traditionally and Commercially Manufactured Kefir. J Dairy Sci. 2016; 99(9):7043-7048.

39. Chavarri F J, De Paz M, Nunez M. Cryoprotective Agents for Frozen Concentrated Starters From Non-Bitter Streptococcus Lactis Strains. Biotec Letters. 1988; 10(1):11-16.

40. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. Relevant Factors for the Preparation of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. Int Dairy J. 2004; 14(10):835-847.

41. Mazur, P. Cryobiology: The Freezing of Biological Systems. Science. 1970; 168(3934):939-949.

42. Brashears MM, Gilliland SE. Survival During Frozen and Subsequent Refrigerated Storage of Lactobacillus Acidophilus Cells as Influenced by the Growth Phase. J Dairy Sci. 1995; 78(11):2326-2335.

43. Fernandez Murga ML, De Ruiz Holgado AP, De Valdez GF. Survival Rate and Enzyme Activities of Lactobacillus Acidophilus Following Frozen Storage. Cryobiology. 1998; 36(4):315-319.

44. Harrison MA , Huang YW, Chao CH, Shineman T. Fate of *Listeria Monocytogenes* on Packaged, Refrigerated, and Frozen Seafood. J Food Prot. 1991; 54(7):524- 527.

45. Palumbo SA, Williams A. Resistance of *Listeria Monocytogenes* to Freezing in Foods. Food Microbiol. 1991; 8(1):63-68.

46. Wai SN, Mizunoe Y, Takade A, Yoshida S. A Comparison of Solid and Liquid Media for Resuscitation of Starvation- and Low-Temperature-Induced Nonculturable Cells of *Aeromonas Hydrophila*. Arch Microbiol. 2000; 173(4):307-310.

47. Pawlowski DR, Metzger DJ, Raslawsky A, Howlett A, Siebert G, Karalus RJ, et al. Entry of Yersinia Pestis Into the Viable but Non Culturable State in a Low Temperature Tap Water Microcosm. PLoS One. 2011; 6(3):e17585.

48. Zeng B, Zhao G, Cao X, Yang Z, Wang C, Hou L. Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella Typhi*. BioMed Res Int. 2013; 907170.

49. 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.

50. McGann P, Wiedmann M, Boor KJ. The Alternative Sigma Factor sB and the Virulence Gene Regulator PrfA Both Regulate Transcription of Listeria Monocytogenes Internalins. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(9):2919-2930.

51. Duodu S, Holst-Jensen A, Skjerdal T, Cappelier JM, Pilet MF, Loncarevic S. Influence of Storage Temperature on Gene Expression and Virulence Potential of Listeria Monocytogenes Strains Grown in a Salmon Matrix. Food Microbiol. 2010; 27(6):795-801.

52. Roszak DB, Grimes DJ, Colwell RR. Viable but Nonrecoverable Stage of *Salmonella Enteritidis* in Aquatic Systems. Can J Microbiol. 1984; 30(3):334-338.

53. Bunic S, Avery SM, Rogers AR. Listeriolysin O Production and Pathogenicity of Non-Growing Listeria Monocytogenes Stored at Refrigeration Temperature. Int J Food Microbil. 1996; 31(1-3):133-147.

54. Ferreira A, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of sB in Heat, Ethanol, Acid, and Oxidative Stress Resistance and During Carbon Starvation in Listeria Monocytogenes. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(10):4454-4457.

55. Sue D, Fink D, Wiedmann M, Boor KJ. sB-Dependent Gene Induction and Expression in Listeria Monocytogenes During Osmotic and Acid Stress Conditions Simulating the Intestinal Environment. Microbiology. 2004; 150(Pt 11):3843-3855.

56. Ferreira A, Sue D, O'Byrne CP, Boor KJ. Role of Listeria Monocytogenes SB in Survival of Lethal Acidic Conditions and in the Acquired Acid Tolerance Response. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(5):2692-2698.

57. Sue D, Boor KJ, Wiedmann M. sB-Dependent Expression Patterns of Compatible Solute Transporter Genes Opuca and lmo1421 and the Conjugated Bile Salt Hydrolase Gene bsh in *Listeria Monocytogenes*. Microbiology. 2003; 149(Pt 11):3247-3256.

58. Geoffroy C, Gaillard JL, Alouf JE, Berche PE. Purification, Characterization and Toxicity of the Sulfhydryl-Activated Hemolysin Listeriolysin 0 From *Listeria Monocytogenes*. Infect Immun. 1987; 55(1):1641-1646.