بررسی ورود باکتری *Listeria monocytogenes* به حالت «زنده اما غیر قابل کشت» در فرآیند حرارتی فرآوری مواد غذایی

مهدی ذوالفقاری [۱]، مسعود رضائی [۲*]، مهدی فروزنده مقدم [۳]، اشرف محبتی مبارز [۴]، هدایت حسینی [۵]

۱- دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی- گروه شیلات- دانشکده علوم دریایی- دانشگاه تربیت مدرس.
۲- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی- دانشکده علوم دریایی- دانشگاه تربیت مدرس
۳- دانشیار گروه بیوتکنولوژی پزشکی- دانشکده علوم پزشکی- دانشگاه تربیت مدرس
٤- دانشیار گروه باکتری شناسی پزشکی- دانشکده علوم پزشکی- دانشگاه تربیت مدرس
۵- استاد گروه صنایع غذایی- دانشکده و انستیتو تغذیه و صنایع غذایی- دانشگاه شهید بهشتی

(تاریخ دریافت: ۹۳/٤/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/٦/۱۱)

چکیده

باکتری *Listeria monocytogenes* یکی از خطرناک‌ترین باکتری‌ها در محصولات غذایی است که موجب ۲۰ تا ٪۳۰ مرگ و میر در مبتلایان می‌گردد. از جمله غذاهایی که عامل لیستریوزیز است، غذاهای آماده مصرف (RTE) هستند. بنابراین روش‌های مناسب حرارت‌دهی برای حذف این پاتوژن در فرآیند تولیدمحصول نیاز است. *L. monocytogenes* قدرت ورود به حالت «زنده اما غیر قابل کشت» (VBNC) در شرایط نامساعد رشد را دارد. بنابراین این پژوهش به منظور بررسی رفتار این پاتوژن در دمای بالاتر از دماهای پیشنهادی برای حذف این پاتوژن صورت پذیرفت. بدین منظور ۵×۱۰^{۶} باکتری در اواسط رشد لگاریتمی به سه محیط سرم فیزیولوژی، BHI و آبگوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان (FB) تلقیح شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در معرض دمای $۸۵\ ^{o}C$ قرار گرفتند. سپس باکتری‌ها با روش‌های کشت روی محیط BHI آگار غنی شده، لیستریا کروموژنیک آگار، *BacLight*® Live/Dead و RT-PCR به منظور بررسی بیان ژن 16S rRNA قبل و بعد از شوک حرارتی ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که این باکتری توانایی کشت‌پذیری خود را طی شوک حرارتی بالا از دست می‌دهد. نتایج بررسی زنده‌مانی این باکتری با روش *BacLight*® Live/Dead نیز نشان داد این باکتری پس از شوک حرارتی زنده مانده است. نتایج بررسی بیان ژن نیز نتایج قبل را به طور معنی‌داری ($P<0.01$) تأیید و نشان داد که ژن 16S rRNA در باکتری‌های غیر قابل کشت بیان می‌گردد. طبق نتایج این پژوهش، تردید بزرگی در مورد D value در کنترل کیفیت میکروبی برای این پاتوژن در فرآیندهای فرآوری مواد غذایی، به ویژه غذاهای RTE وجود دارد.

کلید واژگان: *L. monocytogenes*، VBNC، بیان ژن، بهداشت غذایی، دمای بالا

* مسئول مکاتبات: rezai_ma@modares.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۱- مقدمه

باکتری *Listeria monocytogenes* یک پاتوژن گرم مثبت و مقاوم غذازاد است که می‌تواند باعث بیماری‌های خطرناکی نظیر لیستریوزیز، مننژیت، سپتی سمی و عفونت‌های رحمی در زنان باردار که باعث تولد زودرس نوزاد یا سقط جنین می‌شود، گردد [۱]. میزان مرگ و میر در بین افراد مبتلا شده به بیماری‌های ناشی از این پاتوژن حدود ٪۳۰ است که آن را به دومین پاتوژن غذازاد که باعث بیشترین مرگ و میر در آمریکا و همین‌طور ایرلند و سراسر اروپامی‌شوند، مبدل ساخته است. بیشترین افرادی که در معرض خطر این باکتری هستند شامل زنان باردار، افراد با سیستم ایمنی سرکوب شده نظیر افراد مبتلا به ایدز، افراد مسن و مبتلایان به سرطان هستند. البته اخیراً در اروپا افراد بالای ۶۰ سال مبتلا به لیستریوزیز تعدادشان افزایش یافته است [۲]. بیشترین غذاهایی که آلودگی به لیستریا از آنها گزارش شده شامل، شیر خام، پنیرها (به ویژه انواع گرماندیده)، سبزیجات خام، گوشت خام، و سوسیس های تخمیر شده با گوشت خام بوده‌اند [۱]. به گزارش ESFA[1] در سال ۲۰۱۰، بیشترین آلودگی دیده شده در محصولات گوشتی آماده مصرف، به ویژه محصولات شیلاتی آماده مصرف بوده است [۳].

باکتری *L. monocytogenes* قادر به تحمل شرایط نامناسب محیطی نظیر نمک زیاد، pH پایین،دمای پایین می‌باشد. این ویژگی‌ها به این پاتوژن امکان زنده ماندن در غذاهایی که به منظور افزایش ماندگاری‌شان فرآوری شده‌اند، را می‌دهد. به دلیل این ویژگی‌ها و اهمیت بالای آن در سلامت عمومی، حضور این میکروارگانیسم در غذاها، برای صنایع غذایی یک مخاطره جدی محسوب می‌شود.

از جمله روش‌های نابودی میکروارگانیسم‌ها در محصولات غذایی فرآیندهای حرارتی می‌باشند. فرآیندهای حرارت‌دهی مواد و فرآورده‌های غذایی با دو هدف اصلی افزایش مطلوبیت بافت، طعم و رنگ محصولات غذایی و همچنین بهبود قابلیت هضم و جذب آن‌ها صورت می‌گیرد. دومین هدف فرآیندهای حرارت دهی که توسط تولیدکنندگان به کار گرفته می‌شود، کاهش بار میکروبی به منظور افزایش زمان ماندگاری محصولات و همچنین افزایش بهداشت محصولات غذایی از طریق حذف میکروارگانیسم‌های مسمومیت‌زا می‌باشد. پارامترهای حرارت‌دهی مورد استفاده در صنایع فرآوری گوشت می‌تواند در زمان و دما با توجه به نوع محصول و میکروارگانیسم هدف بسیار متفاوت باشد. طبق دستورالعمل فائو (FAO,) حرارت ۶۰ ^{o}C به مدت ۵ تا ۸ دقیقه و یا ۷۰ ^{o}C به مدت ۰/۱ تا ۰/۳ دقیقه قادر به از بین بردن باکتری *L. monocytogenes* می‌باشد. از طرفی نیز می‌توان گفت که رسیدن دمای داخلی فرآورده به ۶۰ تا ۸۵ درجه سلسیوس به به عنوان پاستوریزاسیون یا پختن ساده مطرح است که سبب نابودی *L. monocytogenes* می‌گردد[۴ و ۵] . اخیراً کارایی روش‌های محافظت و نگهداری مواد غذایی در مقابل عوامل باکتریایی مورد تردید قرار گرفته است. علاوه بر سازگاری‌های شناخته شده در مورد باکتری‌ها برخی از آن‌ها از توانایی ویژه‌ای برای مقابله با عوامل نامساعد محیطی برخوردارند که به آن‌ها اجازه زنده ماندن در برخی شرایط سخت محیطی را می‌دهد. این توانایی ویژه حاصل ورود باکتری به حالت خاص فیزیولوژیکی است که موجب توقف رشد باکتری، با وجود زنده بودن آن، می‌گردد. به این باکتری‌ها اصطلاحاً «زنده اما غیر قابل کشت[2]» (VBNC) می‌گویند [۶]. باکتری در این حالت به لحاظ متابولیکی فعال است، اما توانایی رشد و تقسیم شدن خود را از دست می‌دهد که نتیجه آن عدم رشد و تشکیل کلنی روی محیط های کشت متداول که به منظور بررسی حضور یا عدم حضور باکتری‌ها استفاده می‌شود، می‌گردد. به همین دلیل حالت VBNC باکتری‌ها یکی از جدی‌ترین چالش‌های فرآیندهای استاندارد کنترل کیفیت مواد غذایی می‌باشد. در صنایع و تولید فرآورده‌های غذایی از روش‌های متعددی جهت از بین بردن میکروارگانیسم‌ها یا فرآوری محصولات استفاده می‌شود که همه می‌توانند به عنوان عوامل نامساعد و استرس‌زای محیطی برای باکتری مطرح باشند و درنتیجه موجب ورود باکتری به حالت VBNC گردند. برخی از این روش‌ها شامل دمای بالا، سرمایش، استفاده از تغییر pH و شوری، استرس اسمزی، تغییر میزان اکسیژن محیط و دیگر روش‌های حفاظت نگهداری مواد غذایی می‌باشد [۶]. استفاده از این روش‌ها در صورت القاء حالت

1. European Food Safety Authority

2. Viable But Non Culturable

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

VBNC در باکتری موجب عدم تشخیص باکتری در فرآیندهای متداول کنترل کیفیت شده و می‌تواند سبب به مخاطره افتادن سلامت عمومی جامعه گردد [۷]. به همین دلیل هدف از این مطالعه بررسی امکان ورود باکتری خطرناک *L. monocytogenes*، به حالت VBNC طی فرآیندهای حرارت دهی با استفاده از بررسی بیان ژن 16S rRNA آن می‌باشد.

۲- 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 به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. باکتری‌ها سپس در محیط BHI براث به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ ^{o}C انکوباسیون شدند. سپس روی محیط BHI آگار کشت شدند و ۲٤ ساعت در ۳۷ ^{o}C انکوباسیون شدند. بعد یک کلنی خالص شده وارد محیط BHI براث شده و پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون در انکوباتور شیکردار در ۳۷ ^{o}C با ۲۰۰ rpm در ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری به همراه گلیسرول در ۷۰ ^{o}C- نگداری شدند.

محیط‌های مورد بررسی

امکان ورود باکتری *L. monocytogenes* به حالت VBNC در دمای بالای فرآوری در سه محیط سرم فیزیولوژی (به عنوان شرایط عدم وجود مواد تغذیه‌ای و ماتریکس محافظت کننده) کشت BHI براث (شرایط محیط تغذیه‌ای غنی) و آبگوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) Fish Broth (FB) (شرایط ماتریکس گوشت ماهی) مورد مورد بررسی قرار گرفت. محیط BHI براث طبق پروتوکل شرکت مربوطه آماده سازی و اتوکلاو گردید.

آماده‌سازی محیط آبگوشت ماهی قزل آلای رنگین کمان (FB)

عصاره ماهی قزل آلای رنگین کمان به روش Nilsson و همکاران [۸] آماده گردید. در این روش ابتدا قطعات ماهی با آب مقطر به نسبت ۱:۲ (وزنی/حجمی) به مدت ۱۰ دقیقه فیلتر شد. عصاره حاصل با افزودن ۵/۹۸ گرم در لیتر KH2PO4 و ۹/۷۵ گرم در لیتر K2HPO4 بافری شده و pH آن با استفاده از HCl ۱ مولار در ٦/۲ ثابت شد. عصاره تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ ^{o}C استریل گردید و تا ۲٤ ساعت پیش از تلقیح در دمای ٤ ^{o}C نگداری شد.

آماده سازی باکتری‌ها جهت تلقیح به محیط های کشت

به منظور تلقیح محیط‌های مورد بررسی، ابتدا باکتری‌ها از ذخیره ۷۰ ^{o}C- وارد محیط BHI براث شده و پس از یک شب انکوباسیون در ۳۷ ^{o}C در انکوباتور شیکردار با شدت ۲۰۰ rpm، روی محیط BHI آگار کشت داده شدند. پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ ^{o}C انکوباسیون شدند. سپس یک کلونی خالص به ۱۰ میلی‌لیتر محیط BHI براث استریل منتقل شد و در انکوباتور شیکردار با ۲۰۰ rpm در ۳۷ ^{o}C انکوباسیون شروع گردید. رشد باکتری‌های مورد نظر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتورمتر در OD_{600} nm کنترل گردید و باکتری‌ها در جذب حدود ۰/٤ 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 [۹]. همزمان با بررسی میزان جذب با اسپکتروفتومتر، کشت باکتریایی نیز روی محیط BHI آگار صورت گرفت و پلیت‌ها پس از ٤۸ ساعت انکوباسیون مورد شمارش قرار گرفتند. جذب ۰/٤ در حدود ٦ ساعت پس از تلقیح به دست آمد (شکل ۱).

تلقیح باکتری‌ها به محیط‌های مورد مطالعه

بدین منظور ابتدا باکتری‌ها در جذب ۰/٤ در ۷۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس به منظور حذف محیط قبلی مجدداً با سرم فیزیولوژی شست و شو و سانتریفیوژ شدند. باکتری‌ها با غلظت ۵×۱۰^{۷} باکتری در هر میلی‌لیتر وارد سرم فیزیولوژی شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به ۹۰۰ میکرولیتر محیط‌های سرم فیزیولوژی (به عنوان شرایط عدم وجود مواد تغذیه‌ای و ماتریکس محافظت کننده) کشت BHI براث (شرایط محیط تغذیه‌ای غنی) و آبگوشت ماهی قزل آلا (شرایط ماتریکس گوشت ماهی) که قبلاً در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری توزیع شده بودند وارد گردید تا غلظت ۵×۱۰^{٦} باکتری در هر ویال بدست آید. پس از تلقیح از تیمار ۳ نمونه به طور

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

تصادفی جهت تعیین تعداد اولیه باکتری روی محیط BHI آگار کشت شد.

حرارت دهی نمونه‌ها

نمونه‌ها در درجه حرارت ^{o}C ۸۵، به عنوان حد بالایی گزارش شده جهت حذف باکتری *L. monocytogenes* در فرآیندهای حرارتی حداقلی، به مدت ۱۰ دقیقه جهت اطمینان از رسیدن دمای مرکز میکروتیوب‌ها به ^{o}C ۸۵ با استفاده از دستگاه ترموبلاک (Biometra, Germany) انکوباسیون شدند (دمای ترموبلاک از قبل به ^{o}C ۸۵ رسیده بود). میکروتیوب‌ها هر چند دقیقه یکبار به سرعت سر وته می‌شدند تا توزیع دمایی یکنواخت‌تری داشته باشند. دمای مرکز ۱ میکروتیوب از هر تیمار بدون باکتری با استفاده از دماسنج (Ebro, Germany) دیجیتال جهت اطمینان از رسیدن دمای مرکز میکروتیوب‌ها به ^{o}C ۸۵ کنترل می‌شد.

نمونه‌برداری

در انتهای فرآیند حرارت‌دهی نمونه‌ها به منظور بررسی حضور باکتری‌های کشت پذیر روی محیط BHI آگار غنی شده با ٪۰/۶ عصاره مخمر و ٪۰/۱ سدیم پیروات، به منظور احیاء احتمالی باکتری‌های زنده صدمه دیده و محیط اختصاصی لیستریا کروموژنیک آگار کشت داده شدند. به منظور تعیین زنده بودن باکتری‌ها از دو روش *BacLight*® Live/Dead و بررسی کیفی بیان ژن 16S rRNA استفاده گردید.

روش *BacLight*® Live/Dead

بدین منظور ابتدا ۱ میلی‌لیتر نمونه در ۷۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید و بعد پلت باکتری در ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی وارد شد. سپس باکتری‌ها با رنگ پروپیدیوم یداید (PI) (رنگ قرمز فلوروسنت) (Sigma Aldrich, USA) با غلظت ۷۰۰ nm و Syto9 (Molecular Probes, Invitrogen, USA) با غلظت ۱/۲۵ µM رنگ آمیزی و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی انکوباسیون شدند. µ ۵ از نمونه روی لام قرار داده شده و پس از پوشاندن با لامل با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت لانگ باند مشاهده گردید. سلول‌هایی که به رنگ سبز بودند به عنوان زنده و سلول‌هایی که به رنگ قرمز بودند به عنوان سلول مرده شمارش شدند. از مقایسه نتایج این بخش با نتایج حاصل از کشت باکتری روی BHI آگار غنی شده حضور باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت بررسی گردید [۱۰].

بررسی بیان ژن

بررسی بیان ژن یکی از دقیق‌ترین روش‌ها در تعیین حضور باکتری‌های VBNC است. بدین منظور ژن 16S rRNA به عنوان ژن خانه‌گردان این باکتری مورد بررسی قرار گرفت [۱۱]. برای بررسی بیان این ژن مراحل زیر به ترتیب انجام شد.

استخراج RNA باکتری

بدین منظور از کیت شرکت توپازژن کاووش استفاده گردید که مراحل آن به طور خلاصه به شرح زیر است. پس از سانتریفیوژ باکتری و خروج محیط کشت آن، µl ۱۰۰ آنزیم لیزوزیم با غلظت mg/ml ۲۰ و µl ۱۰ آنزیم پروتئیناز K با غلظت mg/ml ۱۰ (SinaClon, Iran) به باکتری‌ها اضافه شده و با سمپلر همگن گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ^{o}C ۳۷ به منظور لیز اولیه باکتری‌ها انکوباسیون شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر محلول توپازول به نمونه اضافه شده و ۵ دقیقه در دمای اتاق جهت تفکیک کمپلکس‌های نوکلئوپروتئینی انکوباسیون شد. بعد µl ۲۰۰ کلروفرم سرد به آن اضافه شده و ۱۰ تا ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوباسیون شد و بعد در ۱۲۰۰۰ دور در دمای ^{o}C ۸- ۲ سانتریفیوژ گردید. سپس لایه شفاف رویی به تیوب جدید منتقل شده و µl ۵۰۰ 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 سرد (با آب DEPC) ساخته شده به پلت RNA اضافه شده و در g ۷۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه در ۸-۲ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. مایع رویی خراج و پلت RNA در زیر هود در دمای اتاق خشک شد. µl ۱۰۰ آب DEPC ۵۵ درجه به پلت RNA اضافه و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در ۵۵ درجه RNA حاصل تا زمان استفاده در ^{o}C ۷۰- نگهداری گردید.

برای حذف DNA ناشی از آلودگی با استفاده از کیت DNase شرکت سیناکلون به شرح زیر استفاده گردید.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

به ازای هر µg RNA ۱ مقدار µl ۱ بافر MgCl2 (10X) و µl ۰/۵ آنزیم DNase افزوده و با استفاده از DEPC حجم نهایی را به µl ۱۰ رسانده شد. ۲- مخلوط را در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون گردید. ۳- مقدار µl ۱ EDTA با غلظت mM ۵۰ به میکروتیوب افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در °C ۶۵ به منظور توقف واکنش انکوباسیون شد. RNA حاصل به منظور 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. به منظور سنتز cDNA از کیت شرکت کیاژن طب استفاده شد. بدین منظور µl ۱ رندوم هگزامر به µl ۱۰ از RNA تیمار شده با DNase I اضافه شده 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 به مدت ۶۰ دقیقه در °C ۳۷ انکوباسیون گردید. در نهایت نمونه حاوی cDNA سنتز شده می‌باشد.

cDNA سنتز شده به منظور انجام فرآیند PCR مورد استفاده قرار گرفت.

فرآیند PCR

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

برای تهیه مستر میکس جهت انجام عملیات PCR به صورت زیر اجزاء واکنش را 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 را به مدت ۱۰ ثانیه سانتریفیوژ جزئی شد تا قطراتی که روی جداره میکروتیوپ بود، حذف شود. سپس این میکروتیوپ را در دستگاه PCR قرار داده و تنظیمات دستگاه را به صورت زیر انجام شد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش به صورت زیر بود [۱۲].

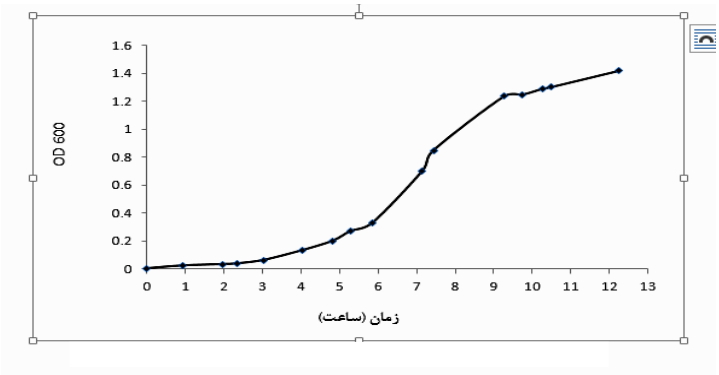
F: TTA GCT AGT TGG TAG GGT
R: AAT CCG GAC AAC GCT TGC

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 ۶۰-۵۰ 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 ۱/۶٪ آگارز صورت پذیرفت و سپس ژل با استفاده از دستگاه ژل داک عکس‌برداری گردید.

۳- نتایج

بررسی نمودار رشد باکتری *L. monocytogenes* با استفاده از سنجش میزان جذب نور در طول موج nm ۶۰۰ در شکل ۱ نشان داده شده است. باکتری‌ها در OD ~ ۰/۴ (۵×۱۰^{۷}) به اواسط مرحله لگاریتمی رسیدند.



شکل ۱ نتایج بررسی روند رشد باکتری با روش سنجش میزان جذب نور در طول موج nm ۶۰۰

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

بررسی کشت پذیری باکتری‌ها در محیط BHI آگار غنی شده و لیستریا کروموژنیک آگار

نتایج بررسی کشت پذیری رو محیط غنی شده با عصاره مخمر و سدیم پیروات و محیط اختصاصی لیستریا کروموژنیک آگار در هر سه تیمار سرم فیزیولوژی، BHI، FB نشان داد، این باکتری در شوک دمایی ۸۵ ^{o}C قابلیت رشد روی محیط‌های کشت متداول و غنی شده را ندارد (جدول ۱).

جدول ۱ نتایج کشت پذیری باکتری *L. monocytogenes* پس از شوک حرارتی

	قبل از شوک	بعد از شوک در محیط غنی شده	بعد از شوک روی محیط اختصاصی کروموژنیک
سرم فیزیولوژی	+	–	–
BHI	+	–	–
FB	+	–	–

+: مشاهده کلونی باکتری *L. monocutogenes* در محیط کشت. –: عدم مشاهده کلونی باکتری *L. monocytogenes*

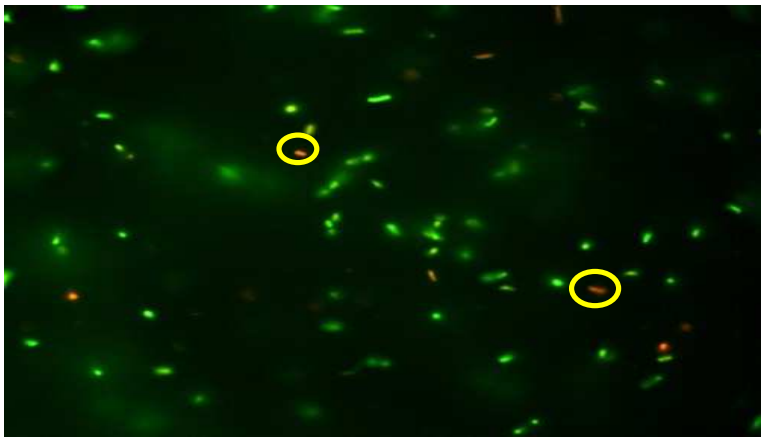
نتایج بررسی تیمارها با روش *BacLight*® Live/Dead

نتایج بررسی تیمارهای شوک حرارتی با روش *BacLight*® Live/Dead نشان داد که در تیمار حرارتی در هر سه محیط سرم فیزیولوژی، BHI و FB، باکتری *L. monocytogenes* مقاومت کرده و زنده مانده است (جدول۲ و شکل ۲). همانطور که در تصویر مشاهده می شود باکتری‌های به رنگ سبز درخشان باکتری‌های زنده و آن‌هایی که به رنگ قرمز هستند (دو موردشان با دایره روی تصویر مشخص شده‌اند)، باکتری‌های مرده می‌باشند.

جدول ۲ نتایج بررسی زنده بودن باکتری *L. monocytogenes* پس از شوک حرارتی با روش *BacLight*® Live/Dead

	قبل از شوک	بعد از شوک در محیط غنی شده
سرم فیزیولوژی	+	+
BHI	+	+
FB	+	+

+: حضور باکتری زنده. –: عدم حضور باکتری زنده

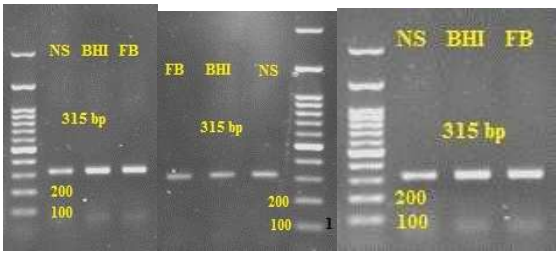


شکل ۲ تصویر باکتری‌های رنگ آمیزی شده با رنگ‌های فلوروسنت جهت بررسی زنده بودن در روش *BacLight*® Live/Dead.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

نتایج بررسی بیان ژن

نتایج الکتروفورز محصول PCR از cDNA سنتز شده از روی RNA استخراج شده از باکتری‌های پس از شوک دمایی در شکل ۳ نشان داده شده است. این نتایج نشان دهنده بیان ژن 16S rRNA تیمارهای BHI85 و FB85 می‌باشد. طبق این نتایج باکتری *L. monocytogenes* در دمای ۸۵ ^{o}C به مدت ۲۰ دقیقه قادر به زنده ماندن بوده و ژن خانه‌گردان خود را نیز بیان می‌کند.



شکل ۳ نتایج الکتروفورز محصول PCR حاصل فرآیند بررسی بیان ژن 16S rRNA در تیمارهای (سرم فیزیولوژی) NS: Normal Salin، BHI: BHI Broth و FB: Fish Broth

از تطابق نتایج بررسی بیان ژن و بررسی باکتری‌ها با روش *BacLight*® Live/Dead با کشت باکتریایی رو محیط کشت کروموژنیک به این نتیجه زنده بودن باکتری‌ها پس از شوک دمایی و غیر قابل کشت بودن آن‌ها اثبات می‌گردد و می‌توان آن‌ها را باکتری‌های زنده اما غیر قابل کشت (VBNC) در نظر گرفت.

٤- بحث

فرآیندهای حرارتی به منظور حذف پاتوژن‌ها از محصولات غذایی، از مهم‌ترین و متداول‌ترین ابزارهای تأمین بهداشت مواد غذایی است. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که کشت این باکتری پس از شوک حرارتی در دمای ۸۵ ^{o}C به مدت ۲۰ دقیقه منتج به عدم تشکیل کلونی در محیط‌های کشت غنی شده و اختصاصی باکتری *L. monocytogenes* گردید. این نتایج با گزارشات و دستورالعمل‌های سازمان‌های معتبر هم‌خوانی دارد. سلبی و همکاران [۱۳] گزارش کردند که D-value برای *L. monocytogenes* در همبرگر با مقادیر چربی، پروتئین و رطوبت متفاوت در ٦٥ ^{o}C بین ۱/۷-۱/۵ می‌باشد و پس از این مقدار در محیط کشت حاوی پیروات سدیم هیچ‌گونه کلونی باکتریایی مشاهده نگردید. طبق دستورالعمل فائو (FAO, حرارت ٦٠ ^{o}C به مدت ۵ تا ۸ دقیقه و یا ۷۰ ^{o}C به مدت ۰/۱ تا ۰/۳ دقیقه قادر به از بین بردن باکتری *L. monocytogenes* می‌باشد.

سویوتموز و اتینکایا [١٤] طی بررسی مقاومت حرارتی باکتری *L. monocytogenes* در کوفته گزارش کردند که دمای ۸۵ ^{o}C به مدت ٤ دقیقه جهت حذف کامل این باکتری در تعداد کمتر از 10^{4} cfu/g کافی است. کارپنتر و هاریسون [۱۵] گوشت مرغ را با 10^{5}-10^{7} باکتری *L. monocytogenes* در گرم تلقیح کردند و گزارش کردند که این باکتری قادر به زنده ماندن در دمای داخلی نمونه‌ها در ٦٥/٦ -٨٢/٢ ^{o}C می‌باشد. بویل و همکاران [١٦] گزارش کردند که زمان مرگ این باکتری در گوشت‌ها در ٦٠، ٦٥ و ۷۵ ^{o}C به ترتیب ۲/۵۷، ۰/۷۵ و ۰/۲۳ دقیقه می‌باشد. کوتی و همکاران [۱۷] گزارش کردند که پس از پخت کامل گوشت جوجه دارای 10^{6} باکتری در هر گرم به مدت ۲۸ دقیقه با میانگین دمایی ۸۵ ^{o}C هیچ باکتری زنده‌ی لیستریا مشاهده نشد. با توجه به مدت زمان طولانی‌تر و دمای بالای حرارت دهی در این پژوهش بدست آمدن این نتایج بدیهی به نظر می‌رسید.

با توجه به گزارشات مشابه در بسیاری از پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه و همچنین دستورالعمل‌های استاندارد ارائه شده جهت حذف باکتری *L. monocytogenes* از مواد غذایی طی فرآیندهای حرارتی، در نگاه اول استفاده از این دماها به نظر منطقی و قابل اعتماد می‌رسد. اما پژوهش‌های جدیدتر با استفاده از روش‌های تشخیص نوین نظیر روش *BacLight*®

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Live/Dead منتج به نتایج متفاوتی از آن‌چه با روش‌های کشت متداول به دست می‌آید، شده است. این روش بر مبنای تشخیص مستقیم میکروسکوپی، بر مبنای وجود غشاء سیتوپلاسمی سالم می‌باشد.

نتایج بررسی باکتری‌ها با روش *BacLight*® Live/Dead در این پژوهش نشان داد شوک دمایی ۸۵ °C *L. monocytogenes* در ماتریکس آبگوشت ماهی قزل آلا و محیط BHI سبب ورود این باکتری به حالت VBNC می‌گردد. این نتایج با نتایج دیگر پژوهشگران که دماهای پایین‌تر را بررسی کرده‌اند هم‌خوانی دارد. تحقیقات آگوستون [۱۸] نشان داده است که قرار گرفتن *L. monocytogenes* در معرض دمای زیر حد کشنده ۴۸ °C به مدت ۳۰ دقیقه باعث افزایش D-value باکتری از ۳/۷ دقیقه به ٤/٦ دقیقه در ٦۰ °C می‌شود. تحقیقات اوهمچنین نشان داده است که بررسی زنده بودن باکتری پس از شوک دمایی با روش *BacLight*® Live/Dead و روش کشت متداول تفاوت معنی‌داری دارد، به طوری با قرار دادن سلول‌ها در معرض دمای ٦۰ °C به مدت ۹ دقیقه، تنها ۱٪ سلول‌ها کشت‌پذیر بودند، در صورتی که پس از ارزیابی با روش *BacLight*® Live/Dead مشخص شد که تقریباً ۱۰۰٪ سلول‌ها زنده‌اند. این نشان می‌دهد که *L. monocytogenes* می‌تواند در شوک دمایی ٦۰ °C وارد حالت VBNC شود.

از جدیدترین روش‌های مورد استفاده جهت تشخیص زنده بودن باکتری‌ها که کاربردش نیز رو به افزایش است، روش RT-PCR است که بیان ژن‌ها را تشخیص می‌دهد. به خاطر نیمه عمر پایین RNA باکتریایی که حدود ۵-۳ دقیقه است [۱۹]، ادامه بیان ژن در سلول باکتریایی، شاخص بسیار مطلوب جهت تشخیص زنده بودن باکتری است. نتایج حاصل از بررسی بیان ژن 16S rRNA در باکتری *L. monocytogenes* در این پژوهش نشان داد که باکتری‌هایی که قادر به رشد در محیط‌های کشت غنی شده و اختصاصی نبودند، همچنان ژن 16S rRNA را که یک ژن خانه گردان[3] محسوب می‌شود، بیان می‌کردند. تاسارا و استفان [۱۲] با ارزیابی ۵ ژن خانه‌گردان در ۱٦ سویه باکتری *L. monocytogenes* در شرایط متغیر دما، شوری و pH، گزارش کردند که ژن 16S rRNA در شرایط مختلف محیطی بیان می‌شود و مناسب‌ترین آن‌ها به عنوان ژن مرجع در مطالعات بیان ژن این باکتری است. این نتایج با به دست آمده در این پژوهش هم‌خوانی دارد. بنابراین در این پژوهش این ژن به عنوان شاخص زنده بودن این باکتری در نظر گرفته شد. کوتارد و همکاران [۲۰] نیز در مطالعه بیان ژن‌های حالت VBNC باکتری *Vibrio parahaemolyticus* گزارش کردند که بررسی بیان ژن‌های 16S rRNA و rpoS در این باکتری می‌تواند به عنوان شاخص مناسبی از زنده بودن این باکتری در حالت فعال و VBNC باشد.

عوامل گوناگونی می‌توانند موجب القاء حالت VBNC در باکتری‌ها گردند. این عوامل نظیر گرسنگی، انکوباسیون در خارج از دمای مطلوب رشد، افزایش یا کاهش فشار اسمزی، غلظت اکسیژن، نگهدارنده‌های متداول مواد غذایی، فلزات سنگین و حتی نور سفید می‌باشند [۷]. البته این‌که کدام عوامل نقش مهم‌تری در ایجاد حالت VBNC در باکتری دارند بسته به گونه و حتی سویه باکتری متفاوت است. مثلاً برای باکتری *Vibrio vulnificus* دمای کمتر از ٤ °C در القاء حالت VBNC موثر است، در حالی که لینا و همکاران [۲۰] گزارش کردند که در *Sinorhizobium arboris* استرس حرارتی این حالت را القاء می‌کند. برای ورود باکتری به حالت VBNC طی فرآیند حرارت‌دهی، باکتری باید دارای مقاومت حرارتی لازم باشد.

مقاومت حرارتی *L. monocytogenes* در غذاها بسیار متفاوت است [۲۲]. مقاومت حرارتی این باکتری همچنین بستگی زیادی به مرحله، شرایط رشد، محیط احیاء و ویژگی‌های غذاها دارد (محتوای نمک، فعالیت آبی، اسیدیته، حضور ممانعت کننده‌ها). میکروارگانیسم‌ها به عنوان موجوداتی شناخته شده‌اند که قادر به افزایش تحمل دمایی خود وقتی در معرض استرس‌های گوناگون محیطی نظیر استرس حرارتی زیر حد کشنده، استرس اسمزی، گرسنگی، اسیدی، قلیایی، اتانول، پروکسید هیدروژن قرار بگیرند، هستند [۲۳]. مقاومت حرارتی باکتری‌ها همچنین تحت تأثیر شرایط قبلی رشدشان، تفاوت بین سویه‌ها و شرایط شوک دمایی نظیر pH و حضور دیگر ترکیبات، می‌باشد. غذاهایی که به منظور حفظ برخی ویژگی‌های تغذیه‌ای، طعم و بافت و غیره، لازم است در معرض دمای پایین‌تر برای مدت زمان طولانی‌تر قرار بگیرند،

3. Housekeeping gene

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

مستعد عدم نابود شدن میکروارگانیسم‌هایی که قدرت افزایش تحمل دمایی را دارند، می‌باشند.

پژوهش‌های متعددی تا کنون ورود باکتری *L. monocytogenes* را به حالت VBNC در شرایط مختلف گزارش کرده‌اند. Besnard و همکاران [۲٤] اثر عوامل محیطی شوری، دمای پایین، نور سفید را در القاء حالت VBNC در این باکتری بررسی و گزارش کردند که همه این عوامل با شدت و ضعف بر ورود این باکتری به حالت VBNC موثرند. کاپلیر و همکاران [۲۰] نیز ورود *L. monocytogenes* به حالت VBNC را شرایط گرسنگی و دمای ٤ ^{o}C گزارش کردند. با این وجود گزارشی مبنی بر ورود این باکتری به حالت VBNC طی فرآیند حرارتی موجود نیست. حالت VBNC این باکتری از نظر بهداشت مواد غذایی اهمیت بالایی دارد. زیرا با وجود عدم تشخیص داده شدن در فرآیند کنترل کیفیت مواد غذایی که طبق روش‌های استاندارد کشت باکتریایی صورت می‌پذیرد، می‌تواند به انسان منتقل گردد. البته این‌که این باکتری VBNC پس از ورود به بدن چه رفتاری نشان خواهد داد هنوز ناشناخته است، اما مطالعاتی مبنی بر توانایی احیاء و حفظ قدرت بیماری‌زایی این باکتری وجود دارد.

در برخی موارد پژوهشگران گزارش کرده‌اند که باکتری در این حالت غیر بیماری‌زاست، برای مثال کاپلیر و همکاران [۲۰] گزارش کردند که باکتری *L. monocytogenes* در حالت VBNC غیر بیماری‌زاست و متعاقباً گزارش کردند که در شرایط خاصی نظیر انکوباسیون در مجاورت جنین در تخم مرغ می‌تواند بیماری‌زایی را در آن‌ها فعال کند [۲۵] که این موضوع به علاوه افزایش مقاومت این باکتری‌ها به شرایط نامساعد محیطی اهمیت این حالت از باکتری را بیش از پیش افزایش می‌دهد. این که چه تغییراتی در باکتری منتج به ورود آن به حالت VBNC می‌گردد را باید در تغییرات فیزیولوژکی آن و بالتبع در تغییرات بیان ژن‌های ویژه در آن جستجو نمود. وین و همکاران [۲٦] طی پژوهشی به بررسی تغییرات بیان ژن‌های باکتری *L. monocytogenes* طی شوک حرارتی ٤٨ ^{o}C به مدت ٤٠ دقیقه پرداختند و گزارش کردند که در ۳ دقیقه اول شوک ٪۲۵ ژن‌های این باکتری میزان بیان‌شان تغییر کرد ولی پس از ٤٠ دقیقه تنها ٪۲ ژن‌های آن بیان متفاوتی نسبت به گروه کنترل نشان دادند که این امر نشان از سازگار شدن تدریجی این باکتری در مقابل شوک‌های محیطی است. نکته جالب توجه در آن مطالعه این است چندین ژن که به عنوان بخشی از تغییر بیان ژن در پاسخ به استرس حرارتی مشاهده شدند، بخشی از فرآیند مکانیسم SOS و تعمیر DNA و توقف تکثیر سلول نیز بودند. همچنین چندین ژن که در مکانیسم تقسیم سلول و سنتز دیواره سلول نقش دارند، الگوی بیان‌شان طی شوک حرارتی تغییر کرد. این الگوی بیان منتج به طویل شدن سلول‌ها و ممانعت از تقسیم آن‌ها می‌گردد. با توجه به اهمیت باکتری‌های VBNC در امر کنترل بهداشتی فرآورده‌های غذایی و نوپا بودن تحقیقات در این زمینه، امید است که تحقیقات در این زمینه توسط دست اندرکاران مربوطه استمرار یابد.

۵- نتیجه‌گیری کلی

استفاده از فرآیندهای حرارتی از جمله روش‌های مهم در تولید و افزایش ماندگاری و حذف پاتوژن‌های محصولات غذایی می‌باشد. روش‌های استاندارد تشخیص کارایی این فرآیندها در حذف عوامل میکروبی، استفاده از کشت دادن و تشکیل کلونی باکتری‌ها در محیط‌های کشت می‌باشد. بررسی زنده مانی باکتری *L. monocytogenes* طی فرآیند حرارتی، با روش‌های تشخیصی نوین بر مبنای استفاده از رنگ‌های فلوروسنت و بررسی بیان ژن 16S rRNA این باکتری در این پژوهش نشان داد که باکتری خطرناک *L. monocytogenes* طی حرارت دهی در ۸۵ ^{o}C نه تنها نابود نشده، بلکه وارد حالت VBNC (زنده اما غیر قابل کشت) می‌گردد. این امر یک چالش جدید و جدی در امر کنترل کیفیت میکروبی فرآورده‌های غذایی محسوب شده می‌گردد.

٦- سپاس‌گزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند، از همه عزیزانی که در انجام این پژوهش همکاری و مساعدت داشته‌اند، بویژه آقای دکتر نیما خرم آبادی، مسئولین آزمایشگاه‌های گروه باکتری‌شناسی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی و گروه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه تربیت مدرس سپاس‌گزاری نمایند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

۷- منابع

[1] Swaminathan, B. and Gerner-Smidt, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. Microbes Infection, 9(10): 1236-1243.

[2] Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., de Valk, H. 2008. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. Emerg Infect Dis. 14(5), 734-740.

[3] The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. 2010. EFSA Journal, 8(1): 1496.

[4] FAO Corporate Document Repository, Meat processing technology for small- to medium-scale producers.

[5] Brookmire, L. M. 2010. Optimization of the quality and safety of cooked seafood products. PhD. Thesis, Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University, 149p.

[6] Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but non culturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiological Review, 34: 415-425.

[7] Fakruddin,M. D., BinMannan, K. S. and Andrews, S. 2013. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective. ISRN Microbiology, Article ID 703813, 6 pages.

[8] Nilsson, L., Gram, L., Huss, HH. 1998. Growth Control of *Listeria monocytogenes* on Cold Smoked Salmon Using a Competitive Lactic Acid Bacteria. Flora. Journal of Food Protection, (62), 336-342.

[9] Seu, D., Boor, K.J., Wiedmann, M. 2003. sigB-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.

[10] Gião, M. S. Keevil, C. W. 2014. *Listeria monocytogenes* can form biofilms in tap water and enter into the viable but non-cultivable state. Microbial Ecology, 67: 603-611.

[11] Zolfaghari, M., Rezaei, M., Mohebbati Mobarez, A., Forozandeh, M., Hoseyni, H. 2014. 15th International Iranian Congress of Microbiology, 26-28 Agust, Tehran, Iran.

[12] Tasara, T and Stephan, R. 2007. 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 Microbiological Letters, 269: 265-272.

[13] Selby, T. L., Berzins, A., Gerrard, D. E., Corvalan, C. M., Grant, A. M., Linton, A. H. 2006. Microbial heat resistance of *Listeria mon*ocytogenes and the impact on ready-to-eat meat quality after post-package pasteurization. Meat Sciences, 74: 425-434.

[14] Soyutemüz, G. E. and Etünkaya, F. 2005. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in üneg meatballs. Turk Journal of Veterinary Animal Sciences, 29: 319-323.

[15] Carpenter, S.L., Harrison, M.A. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* on processed poultry. Journal of Food Sciences, 54: 556-557.

[16] Boyle, D.L., Sofos, J.N., Schmidt, G.R. 1990. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and ground beef. Juornal of Food Sciences, 55: 327-329.

[17] Coote, P.J., Holyoak, C.D., Cole, M.B. 1991. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* during a process simulating temperatures achieved during microwave heating. Journal of Applied Bacteriology, 70: 489-494.

[18] Agoston, R. 2009. Understanding stress adaptive response in *Listeria monocytogenes.* PhD. Thesis, Corvinus University of Budapest Faculty of Food Science, 138 p.

[19] Conway, T. and Schoolnik G. K. 2003. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. Molecular Microbiology, 47: 879-889.

[20] Coutard, M., Pommepuy, S., Loaec and Hervio-Heath, D. 2005. mRNA detection by reverse transcription–PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable. Journal of Applied Microbiology, 98(4): 951-961.

[21] Leena, A., Räsänen, A., Elväng, M., Jansson, J. and Lindström, K. 2006. Effect of heat stress on cell activity and cell morphology of the tropical rhizobium, *Sinorhizobium arboris*. FEMS Microbiology Ecology, 34: 267-278.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

[22] Kenney, S. J. and Beuchat, L. R. 2004. Survival, growth and thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in products containing peanut and chocolate. Journal of Food Protection, 67: 2205-2211.

[23] Lou, Y. and Yousef, A. E. 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, 157-214. In: *Listeria*, *Listeriosis* and Food Safety, E. T. Ryser and E. H. Marths (Eds.).

[24] 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.

[25] Cappeliera, J.M., Besnarda, V., Rocheb, S.M., Velgeb, P. and Federighia, M. 2007. 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. Veterinary Research, 38: 573-583.

[26] Veen, S. V. D., Hain, T., Wouters, J. A., Hossain, H., Vos, W. M., Abee, T. and Chakraborty, T., Wells-Bennik, M. H. J. 2007. The heat-shock response of *Listeria monocytogenes* comprises genes involved in heat shock, cell division, cell wall synthesis, and the SOS response. Microbiology, 153: 3593-3607.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]

Study of entering of *Listeria monocytogenes* into Viable But Non Culturable form during heat treatment process of foods

Zolfaghari, M. [1], Rezaei, M. [2*], Forozandeh Moghaddam, M. [3], Mohebbati Mobarez, A. [4], Hosseini, H. [5]

1. PhD. Student of Seafood Processing Dept., Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University.
2. Professor, Seafood Processing Dept, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University
3. Associated professor, Dept. of Medical Biotechnology, Faculty of Medical, Tarbiat Modares University
4. Associated professor, Dept. of Medical Bacteriology, Faculty of Medical, Tarbiat Modares University
5. Professor, Dept of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

(Received: 93/4/30 Accepted: 93/6/11)

Listeria monocytogenes is one of the most dangerous bacteria in food products which caused about 20 to 30% fatalities. One of the major foods which caused listeriosis is ready to eat (RTE). So, appropriate heating processing methods are need for elimination of *L. monocytogenes*. These bacteria has ability entering into viable but nonculturable (VBNC) form in unfavorable conditions. So this investigation was aimed to considering behavior of this pathogen at higher temperatures from recommended for elimination of these bacteria. For this purpose, bacteria in 5×10^6 counts in mid log phase were inoculated into two medium BHI Broth and fish Broth (FB) and they exposed to 85 ºC for 10 minutes. Direct plate count on listeria choromogenic agar, *BacLight*® Live/Dead and gene expression of 16S rRNA, the housekeeping gene, were done before and after heat shock. The results show that these bacteria lose their culturability during high heat shock. The results of fluorescent dyes showed the viability of these bacteria after heat shock ($p< 0.01$). The results of gene expression considering confirmed the results of fluorescence dyes and showed that 16S rRNA gene was expressed in nonculturable bacteria. According to these results, there is a big question on the D value on quality control for these bacteria in food processing processes, especially for RTE foods.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, VBNC, Gene expression, Food safety, High temperature

* Corresponding Author E-Mail Address: rezai_ma@modares.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-25]