

بررسی شمارش کلی میکروبی و لیستریا مونوسایتوجنز (*Listeria monocytogenes*) در ماهی های تازه در شهر کرمانشاه

احسان صادقی^۱، علی الماسی^{۲*}، سمیه بهلولی اسکویی^۳

- ۱- گروه علوم تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
- ۲- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
- ۳- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه

چکیده

لیستریا مونوسایتوجنز باکتری بیماریزا فرصت طلبی است که عفونت‌های حاد بنام لیستریوزیس را در حیوانات و انسان باعث می‌شود. این باکتری هم چنین از شایعترین باکتری‌های ایجاد کننده مننژیت نیز می‌باشد که از طریق غذاهای آلوده مانند پنیر، سبزیجات خام، سالاد و ماهی به انسان انتقال می‌یابد. یکی از راه های کنترل وضعیت میکروبی مواد غذایی شمارش کلی میکروب های هوازی می باشد که در این پژوهش به آن پرداخته شده است.

برای ارزیابی آلودگی لیستریایی دویست و شصت ماهی تازه و کامل از فروشگاه های عرضه ماهی سطح شهر کرمانشاه جمع آوری شدند. از مجموع ۲۶۰ ماهی تازه، ۱۶۰ عدد ماهی قزل آلی رنگین کمان از گروه ماهیان سرد آبی و ۱۰۰ عدد کپور معمولی از گروه ماهیان گرم آبی بودند. با به کارگیری دستور العمل کانادایی اصلاح شده FDA، تمام ماهیان برای وجود لیستریا مونوسایتوجنز آزمایش شدند. هم چنین تمامی نمونه ها به کمک محیط کشت پلیت کانت آگار برای شمارش باکتری های مزوفیل هوازی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج این آزمایشات نشان داد که شیوع لیستریا مونوسایتوجنز در فروشگاه های عرضه ماهی سطح شهر کرمانشاه به ترتیب ۱۵ درصد در قزل آلی رنگین کمان و ۱۸ درصد در کپور معمولی می باشد. هم چنین ۳۵ درصد نمونه های ماهی قزل آلا و ۴۸ درصد نمونه های ماهی کپور معمولی شمارش کلی بیش از cfu/gr ۱۰۷ داشتند. با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی کنترل بهداشت در عرضه و نحوه مصرف این محصولات از قبیل تخلیه امعا و احشا و پخت مناسب ضروری می باشد.

واژگان کلیدی: لیستریا مونوسایتوجنز، قزل آلی رنگین کمان، کپور معمولی، کرمانشاه.

*نویسنده مسؤل، پست الکترونیک: alialmasi@yahoo.com

۱. مقدمه

لیستریایک باکتری گرم مثبت داخل سلولی اختیاری است. یکی از گونه‌های این باکتری به نام لیستریا مونوسایتوجنز (*Listeria monocytogenes*) یک باکتری بیماریزای فرصت طلب است که عفونت‌های حادی بنام لیستریوزیس را در حیوانات و انسان باعث می‌شود. لیستریا مونوسایتوجنز از شایعترین باکتری‌های ایجاد کننده مننژیت نیز می‌باشد. این باکتری از طریق غذاهای آلوده مانند پنیر، سبزیجات خام، سالاد آماده فروش و ماهی به انسان انتقال می‌یابد. (Heinitz and Johnson, 1997; Genigeorgis et al., 1991; Ben Embark, 1994; Weagant et al., 1988; farber, 1991). از سال ۱۹۷۹ موارد متعدد شیوع عفونت از طریق سبزیجات، فرآورده های لبنی و ماهی به عنوان حاملین عفونت گزارش شده است (Dillon and EL Shenawy, 1996; Patel, 1992). همه گیری لیستریوز مادرزادی در ارتباط با مصرف ماهی خام که منجر به مرگ شده در نیوزلند گزارش شده است (Farber, 2000). بعضی موارد تک گیر نیز به علت مصرف ماهیهای نیمه پخته و صدف شناسایی شده اند. با این وجود در اغلب موارد منبع شیوع لیستریا هرگز مشخص نشده است (Heinitz and Johnson, 1997). گزارشات متعددی از جداسازی لیستریا مونوسایتوجنز از قسمتهای مختلف بدن ماهی ها از جمله روده، در دنیا وجود دارد (Neduluha and Wetshoff, 1997). از طرفی نشان داده شده که در طی شرایط نگهداری نامناسب ماهی به مرور زمان به علت اتولیز جدار روده امکان نفوذ باکتریهای بیماریزا و عامل فساد از روده به عضلات وجود دارد (Gonzales et al., 2004). با توجه به مطالب ذکر شده و به دلیل افزایش تقاضا در دهه اخیر برای مصرف ماهی پرورشی و نحوه عرضه ماهی به

صورت شکم پر، در این مطالعه وجود لیستریا مونوسایتوجنز در ۲ نوع ماهی تازه قزل آلی رنگین کمان (*Onchorhycus mykiss*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در فروشگاه های عرضه ماهی سطح شهر کرمانشاه مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش کار

تعداد ۱۶۰ ماهی شکم پر و تازه قزل آلی رنگین کمان (با میانگین وزن ۶۲۰ گرم و با میانگین طول ۱۹۵ میلیمتر) و ۱۰۰ ماهی تازه کپور معمولی (با میانگین وزن ۹۴۰ گرم و با میانگین طول ۲۷۴ میلیمتر) به طور تصادفی ساده از ۱۵ فروشگاه عرضه ماهی در فصل بهار در ظروف شیشه ای استریل از ماهی فروشی های سطح شهر کرمانشاه جمع آوری شدند. هر ماهی برای آزمون میکروبی در یک ظرف شیشه ای استریل در کنار یخ خشک به آزمایشگاه میکروب شناسی گروه صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه منتقل گردید. برای جداسازی لیستریا از دستورالعمل کانادایی، اصلاح شده وزارت غذا و داروی امریکا (FDA) استفاده شد (Dillon et al., 1992). به طور خلاصه، یک نمونه ۲۵ گرمی از بخشهای مختلف ابتداء، انتها و وسط بدن ماهی به ۲۲۵ میلی لیتر آبگوشت غنی کننده لیستریا (*Listeria enrichment broth LEB, Merck*) حاوی تیوسیانات پتاسیم (۳۷/۵ گرم در لیتر) و اسید نالیدیکسیک (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) افزوده گردید. LEB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. در مرحله بعد ۰/۱ میلی لیتر از LEB به صورت خطی بر روی محیط جامد انتخابی لیستریا (*Listeria selective agar, Merck*) به همراه اسید نالیدیکسیک کشت داده شد. پلیت های کشت به

آلا و ۱۸ ماهی کپور معمولی نمونه برداری شده از فروشگاه های عرضه ماهی سطح شهر کرمانشاه در این مطالعه لیستریا مونوسایتوجنز سروتیپ 1/b و 1/a و 4b جدا شد. ۳۵ درصد نمونه های ماهی قزل آلا شمارش کلی بیش از 10^7 cfu/gr داشتند و ۴۸ درصد نمونه های ماهی کپور معمولی شمارش کلی بیش از 10^7 cfu/gr داشتند (جدول ۲)، که این میزان به عنوان استاندارد ملی ایران در شمارش کلی میکروبی ماهی تازه (حد نهایی قابلیت مصرف) محسوب می شود. میانگین شمارش کلی باکتری ها در نمونه های ماهی قزل آلا $10^6 \times 6/9$ cfu/gr بود. هم چنین میانگین شمارش کلی باکتری ها در نمونه های ماهی کپور معمولی ($10^7 \times 3/1$ cfu/gr) بود.

۴. بحث و نتیجه گیری

این داده ها با گزارشات وقوع آلودگی از ماهی های دودی و خام در بازار ماهی استان گیلان و تهران مطابقت دارد (Akhondzadeh et al., 2002). هم چنین ۵۶ مورد از ۱۶۰ ماهی قزل آلا مورد آزمایش شمارش کلی بیش از 10^7 cfu/gr داشتند و نیز ۴۸ مورد از ۱۰۰ ماهی کپور معمولی مورد آزمایش شمارش کلی بیش از 10^7 cfu/gr داشتند که این میزان یعنی 10^7 cfu/gr به عنوان استاندارد ملی ایران در شمارش کلی میکروبی ماهی تازه محسوب می شود (Akhondzadeh et al., 2002). در یک بررسی، ۴۰ نمونه از انواع محصولات دریایی تازه از عمده فروشها در باری ایتالیا در سال ۱۹۹۷ جمع آوری و جهت جداسازی لیستریا آزمایش شد که از آنها تنها یک مورد حاوی لیستریا مونوسایتوجنز بود (Aremenise et al., 1997).

مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. برای جداسازی لیستریا، پرگنه های مشکوک با ظاهر زرد مایل به سبز شفاف در پلیت آگار (Brain heart infusion agar, Merck) به صورت خطی کشت داده شده و در طول شب در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تمام پرگنه های تک حاصله مورد آزمایش لام مرطوب با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر، به صورت میکروسکوپی (میکروسکوپ فاز کنتراست ساخت نیکون ژاپن) از نظر حرکت چرخشی مشخص، رنگ آمیزی گرام، تست حرکت در دو درجه حرارت (۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد)، کاتالاز، همولیز، آزمایش تخمیر قند برای (رامنوز، گزیلوز و مانیتول) آزمایش گردیدند و با آنتی سرم تجاری (Difco laboratories ditroit, MI) تعیین سروتیپ شدند. سپس یک نمونه ۲۵ گرمی از بخشهای مختلف ماهی به ۲۲۵ میلی لیتر پپتون واتر ۰/۱ درصد به عنوان رقیق کننده افزوده شد و رقیق سازی ۷ مرحله ادامه پیدا کرد. در پایان ۰/۱ سی سی از رقت های ۱ تا ۷ به پلیت های حاوی محیط کشت پلیت کانت آگار اضافه شد و به شکل سطحی کشت داده شد. پلیت ها ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و در پایان کلونی ها شمارش شدند (Gonzales et al., 2004; Fuchs and Surenderan, 1989).

۳. نتایج

در این مطالعه ۴۲ مورد از ۲۶۰ ماهی تازه که از فروشگاه های عرضه ماهی سطح شهر کرمانشاه جمع آوری شده بودند، از نظر لیستریا مونوسایتوجنز سروتیپ 1/a، 1/b و 4b مثبت بودند که در جدول ۱ نشان داده شده و از ۲۴ ماهی قزل

جدول ۱. شیوع لیستریا مونوسایتوجنز در ماهیان تازه مورد عرضه در فروشگاه های سطح شهر کرمانشاه.

ماه	تعداد نمونه ها	موارد مثبت لیستریا مونوسایتوجنز (درصد) و سروتیپ
قزل آلاهی رنگین کمان	۱۶۰	درصد/تعداد سروتیپ 1/a, 1/b ۲۴(۱۵)
کیور معمولی	۱۰۰	۱۸(۱۸) 1/a, 4b

جدول ۲. شمارش کلی میکروبی در ماهیان تازه مورد عرضه در فروشگاه های سطح شهر کرمانشاه

ماه	تعداد نمونه ها	شمارش کلی میکروبی بیش از 10^7 (cfu/gr) درصد/تعداد
قزل آلاهی رنگین کمان	۱۶۰	۵۶(۳۵)
کیور معمولی	۱۰۰	۴۸(۴۸)

بررسی های انجام شده توسط محققین دیگر از حضور لیستریا مونوسایتوجنز به همراه گونه های سالمونلا پاراتیفی A و B، سالمونلا آنتریتیدیس، اشیریشیا کلی و سایر آنتروباکتریاسه ها در دستگاه گوارش و روده ماهی و آب محل پرورش گزارش شده است (Sugita et al., 1985; Prost, 1997; Morce and Duncan, 1976; Fernandes et al., 1997).

Berg و همکاران نشان دادند که شرایط فیزیولوژیک روده ماهی در انتخاب فلور باکتریایی روده و احتمال جایگزینی و حامل بودن ماهی برای باکتریهای بیماریزا نقش دارد. در ضمن مدت تماس ماهی با آبهای آلوده حاوی این باکتریهای بیماریزا در وضعیت حامل بودن موثر است (Berg and Anderson, 1972). در مطالعه ای دیگر که توسط Nedeluhال و همکاران بررسی کمی و کیفی بر روی میکروفلور باس دریایی و ماهی های آبهای

در تحقیقی دیگر در سال ۱۹۹۶ در یونان از ۱۴ نمونه ماهی تازه ۴۲/۸ درصد گونه های مختلف لیستریا و ۲۱/۴ درصد لیستریا در مونوسایتوجنز جداسازی گردید (EL Shenawy, 1996). در مطالعه دیگری در سوئد در سال ۱۹۹۶ بر روی ۱۵۰ نمونه ماهی بسته بندی شده در خلأ گونه های دیگر لیستریا از ۱۲ مورد از ۵۸ نمونه ماهی گراوادی^۱، ۳ مورد از ۲۶ نمونه ماهی دودی شده به روش سرد و ۱ مورد از ۶۶ نمونه ماهی دودی شده به روش گرم جدا شد (Loncarevic et al., 1996). هم چنین در هند در سال ۱۹۹۶، ۱۷/۲ درصد از ۲۹ نمونه ماهیان مختلف نواحی گرمسیری، از نظر گونه های مختلف لیستریا مثبت بودند (Jeyasekaran et al., 1996).

1. Gravad

نگهداری بوده است و رشد ارگانسیم ممکن است حتی در یک محیط دارای غلظت بالای نمک اتفاق بیفتد و برای سلامتی انسان مضر باشد (Jemmi and Keusch, 1992). این مطالعه نشان می دهد که عادات سنتی مصرف ماهی خام، نیمه پخته و آماده خوردن، که در برخی از نقاط کشور هم چنان رایج است، می تواند همواره یک علت خطر لیستریوز ناشی از مواد غذایی در ایران باشد.

منابع:

- Akhondzadeh, A., Zahraii Salehi, T. and Misaghi, A. 2002. The survey of *Listeria monocytogenes* in fresh and smoked fish and ice used in fresh markets for retaining the freshness of the fish in Tehran and Gilan. J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran 57: 9-12 .
- Aremenise, F., Sebastio, P., Cito, G., Tanier, A., Tiecco, G. and Oreste, E. 1997. Incidence of *Listeria* spp. Fresh Seafood Products. Ind. Aliment. 36: 470-473 .
- Ben Embark, P.K. 1994. Presence, detection, and growth of *Listeria monocytogenes* in sea food: a review. Int. J. Food Microbiol. 23: 17-34 .
- Berg, R.W. and Anderson, A.W. 1972. *Salmonella* and *Edwardsiella* tara in gul feces a source of contamination. Appl. Microbiol. 24: 498-503.
- Dillon, R.M., Patel, T.R. and Rattam, S. 1992. Prevalence of *Listeria* in smoked fish. J. Food Prot. 55: 866-870 .
- Dillon, R.M., and Patel, T.R, 1992. *Listeria* in seafood: a review. J. Food Prot. 55: 1009-1015.
- EL Shenawy, M.A. 1996. *Listeria* species in some aquatic environment in Alexandria. Int. J. Environ. Health Res. 6: 131-140 .
- Farber, J.M. 2000. Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood product. Int. J. Food Microbiol. 62: 251-274.
- Farber, J.M. 1991. *Listeria monocytogenes* in fish product. J. Food Prot. 54: 922-934.
- Fernandes, C.F., Flick, G.J. and Thomas, T.B. 1997. Growth of inoculated

آزاد انجام شد و وضعیت باکتریایی ارگانهای مختلف از قبیل پوست، آبشش و روده ها مورد آزمایش قرار گرفت، باکتری های بیماریزای غذایی انسانی از قبیل *لیستریا مونوسایتوجنز*، *استافیلوکوک طلایی*، *شیگلا دیسانتریه* و گونه های ویبریو جدا گردید و نشان داده شده که ماهیان پرورش یافته در استخر به علت راهیابی آلودگی های مختلف به آب این استخرها از نظر آلودگی به باکتری های بیماریزای غذایی در معرض خطر بیشتری نسبت به ماهی های آب های آزاد می باشند (Neduluha and Wetshoff, 1993). مقایسه مطالعات کمی و کیفی در خصوص میزان آلودگی و نوع آلودگی ماهیان پرورشی به باکتری های بیماریزا برای انسان و سایر جانوران خونگرم نشان می دهد که اولاً درصد آلودگی در ماهیان پرورشی به مراتب بالاتر بوده، ثانیاً منشأ این آلودگی راهیابی فاضلاب های انسانی و به کارگیری کودهای جانوران خونگرم در مزارع پرورشی است (Akhondzadeh et al., 2002). هم چنین Gonzales و همکاران (2004) نشان دادند که در ماهی هایی که امعا و احشا آنها تخلیه نشده به مرور زمان در طی نگهداری، عوامل باکتریایی بیماریزا و باکتری های عامل فساد (از قبیل *آئروموناس*) موجود در روده از جدار روده نفوذ کرده و در محوطه شکمی مشاهده شدند که این امر سبب آلودگی عضلات اطرفی از یک طرف و از طرف دیگر حضور باکتریهای عامل فساد در محوطه شکمی سبب کاهش مدت زمان نگهداری محصول می گردد. بنابراین تمیز کردن ماهی های پرورشی بعد از صید و ارایه ماهی به صورت شکم خالی بسیار مفید و ضروری می باشد (Gonzales et al., 2004). نتایج به دست آمده توسط Jemmi و Keuch نشان داد که آلودگی لیستریا مونوسایتوجنز بعد از پروسه دودی کردن در طی

spp. In smoked and gravid Fish. Acta.Vet. Scand. 37: 13-18.

Mc Adams, T.J., Reinhard, R.G., Flick, G.L., Libbey, G.S. and Smith, S.A. 1995. The incidence of pathogenic microorganism in cultivated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Food Prot. 58: 17-23.

Morce, E.V. and Duncan M.A. 1976. Salmonella as monitors of fecal pollution in the aquatic environment. Environ.Sci. Health A. 11: 597-601.

Neduluha, P.G. and Wetshoff, D. 1993. Microbiological flora of aquacultured hybrid striped bass. J. Food Prot. 56: 1050-1054.

Neduluha, P.G. and wetshoff, D. 1997. Microbiology of striped bass grown in three aquaculture system. Food Microbial. 14: 255-264.

Prost, M. 1997. Fish as a source of infection and parasitic infestations in man. Med. Weter 33: 641-646.

Sugita, H., Tamura, M. and Deguchi, Y. 1985. Enterobacteria present in the gastrointestinal tract of freshwater fish in the tama river. Bull-Coll-Ayric.Vet.Med.NihonUniv. Nichidai nojuho 42: 211-215.

Weagant, S.D., Sado, P.N., Colburn, K.G., Torkelson, J.D., Satanly, F.A., Krane, M.H., Shields, S.C. and Thayer, C.F. 1988. The incidence of Listeria species in frozen seafood products. J. Food Prot. 51: 655-657 .

psychotropic pathogens on refrigerated fillets of cultivated rainbow trout and channel catfish. J. Food Prot. 61: 313-317.

Fuchs, R.S. and Surenderan, P.K. 1989. Incidence of Listeria in tropical fish and fishery products. Lett. Appl. Microbial. 9: 49-51.

Genigeorgis, C., Carniciu, M., Dutulescu, D. and Farrer, T.B. 1991. Growth and survival of Listeria monocytogenes in market cheese stored at 4°C to 30°C. J. Food Prot. 54: 662-668.

Gonzales, C.J., Cardenal, D.P., Pricto, M., Otero, A. and Lopez, M.L.G. 2004. Evaluation of the microbiological safety and sensory quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processed by the sous vide method. Food Microbiol. 21: 193-201

Heinitz, L., and Johnson, J.M. 1997. The incidence of Listeria spp., Salmonella spp., and Clostridium in smoked fish and shellfish. J. Food Prot. 61: 318-323.

Jemmi, T. and Keusch, A. 1992. Behavior of Listeria monocytogenes during processing and storage experimentally contaminated hot smoked trout. Int. J. Food Microbiol. 15: 339-346.

Jeyasekaran, G., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 1996. Incidence of Listeria spp. In tropical fish. Int. J. Food Microbial. 31: 333-340.

Loncarevic, S., Tham, W. and Danielsson, T.T.L. 1996. Prevalence of Listeria monocytogenes and other Listeria