بررسی روند آلودگی لیستریا در ماهی فیتوفاگ دودی شده به روش سرد

پونه امیرخانلو[1]، رضا صفری[2*]، مسعود رضایی[3]، محمد رضا سعیدی اصل[4]

[1] جهاد دانشگاهی مازندران، ساری، ایران

[2] پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

[3] دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، نور، ایران

[4] دانشگاه آزاداسلامی، واحد سبزوار، کروه علوم و صنایع غذایی، سبزوار،ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/٤

چکیده

باکتری لیستریا، یک ارگانیزم است که در آب و خشکی دیده می‌شود. وجود این میکروارگانیزم در غذاهای دریایی آماده مصرف نظیر ماهی دودی سبب مسمومیت غذایی شده که غالباً در نوزادان و افرادی که دارای سیستم ایمنی ضعیفی می‌باشند دیده می‌شود. تعداد ۱۵ عدد از ماهیان به صورت تصادفی انتخاب و پس از خروج محتویات شکمی، کاملاً شست و شو داده شدند. تعداد ۱۵ عدد دیگر نیز به منظور جداسازی مواد زائد خارجی از سطح بدن با آب شیرین شست‌وشو داده شدند. هر دو نمونه از ماهیان شکم پر و شکم خالی در مدت ۳ روز به روش سرد، دود دهی(۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد) گردیدند. بررسی ماهیان تازه، نشان داد که ٤۰ درصد نمونه‌ها آلوده به لیستریا بودند. میزان انتشار لیستریا مونوسیتوژنز و لیستریا اینوکوا در نمونه‌های ماهیان تازه به ترتیب ۳۳ درصد و۲۰ درصد بود. نتایج حاصل از نمونه‌های شکم خالی و شکم پر ماهیان فیتوفاگ دودی شده، نشان داد که هر دو گونه باکتری قادر به زنده ماندن در تیمارهای مختلف ماهیان دودی بودند. در این تحقیق، میزان انتشار لیستریا در نمونه‌های شکم پر، بیش‌تر از شکم خالی بود و بار باکتریایی لیستریا نیز به طور معنی داری در زمان دوددهی افزایش داشت.

واژه‌های کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، لیستریا اینوکوآ، دود سرد، ماهی دودی، ماهی فیتوفاگ.

---

* مسوول مکاتبه : safari1351@gmail.com

۱- مقدمه

سال‌هاست که متخصصان علوم تغذیه، ماهی را به عنوان غذای سلامتی می‌شناسند و آن را برای مصرف توصیه می‌کنند و درست به همین دلیل رقابت بسیار شدیدی بین کشورهای پیشرفته‌ی جهان برای تولید و مصرف ماهی به وجود آمده است(۱). در بسیاری از کشورها ماهی به صورت ماهی کامل و یا خالی و بعضی اوقات هم بدون سر، عمل‌آوری می‌شود. انواع دیگر ماهیان هم به صورت فیله یا اشکال دیگر با خصوصیات مخصوص و با استفاده از روش‌های سنتی دودی می‌گردند. فرآیند دود دهی باعث خشک شدن بخش سطحی بدن ماهی شده که این عمل مانند سد فیزیکی نسبت به عبور میکرو ارگانیزم‌ها عمل نموده، هم‌چنین از طریق به تاخیر انداختن زمان تکثیر میکروفلورهای هوازی، باعث افزایش زمان ماندگاری ماهی می‌شود(۲،۵۳،۵). بعضی از اجزای تشکیل دهنده‌ی دود که در جریان دودی کردن بر سطح خارجی آن نشست می‌کنند دارای خاصیت اکسیداتیو و باکتری کشی و هم‌چنین متوقف کننده‌ی رشد باکتری‌ها بوده که این تغییرات به مدت بقاء، کیفیت، میزان دود و روش کار آن بستگی دارد(۲،٤). باکتری لیستریا کوچک، گرم مثبت و به شکل میله‌ای است که به دمای بالا حساس می‌باشد(٦). این باکتری به طور وسیعی در نقاط مختلف گسترش دارد(۷،۸). سلول‌های این باکتری قادرند در محیط‌های خشک، مرطوب، نمکی و در محیط بدون اکسیژن زنده بمانند (۹). اگر چه رابطه‌ی مستقیمی بین شیوع لیستریا و آلودگی مواد غذائی دریائی گزارش نشده ولی این باکتری از فرآورده‌های دریائی خام و فرآوری شده، جداسازی شده است(۱۰). باکتری لیستریا از نظر مسمومیت غذایی و بیماری لیستریوزیس که در انسان ایجاد می‌کند از اهمیت خاصی برخوردار است(۱۱،۱۲). در ایران مطالعات کمی در ارتباط با جداسازی لیستریا در فرآورده‌های دودی صورت گرفته، لذا نظر به اهمیت موضوع لیستریا در محصولات دودی و تاثیر تیمارهای مختلف در روند رشد این باکتری ضرورت دارد.

ماهی فیتوفاگ در بین ماهیان دودی مورد استفاده در سواحل شمالی کشور علت فراوانی تولید و قیمت ارزان بیش تر مورد توجه مردم می‌باشد. در این پژوهش، تفاوت بین ماهیان فیتوفاگ دودی شکم خالی و شکم پر از حیث بار باکتریایی لیستریا و تغییرات میکروبی ماهی فیتوفاگ در هنگام دودی کردن، مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

تعداد ۳۰ نمونه ماهی فیتوفاگ به صورت تازه تهیه و با رعایت شرایط صحیح به دودخانه شهرستان چمخاله در استان گیلان منتقل گردیدند. ماهیان به دو گروه تقسیم شده و تعداد ۱۵عدد از ماهیان به صورت تصادفی انتخاب و پس از خروج محتویات شکمی، کاملاً شست و شو داده شده و تعداد ۱۵ عدد دیگر بدون تخلیه‌ی شکمی با آب شیرین شست و شو داده شدند. هر دو نمونه از ماهیان شکم پر (ماهی کامل) و شکم خالی (تخلیه‌ی شکمی شده) ٦ روز در آب نمک قرار گرفت . سپس آن‌ها را یک روز در سایه، آویزان کرده تا آب اضافی نمونه‌ها گرفته شود و در مدت ۳ روز به روش دود سرد، دود دهی گردیدند . در این روش، دمای اطاق دود دهی هیچگاه بالاتر از ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد نرفت (۵). پس از پایان زمان دود دهی تیمارها به طور مجزا در یونولیت با کدهای مختلف به آزمایشگاه پژوهشکده‌ی اکولوژی دریای خزر انتقال یافته، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۲-۱-آنالیز آزمایشگاهی

از سه قسمت متفاوت ماهیان دودی انتقال یافته (سینه ای، شکمی و دمی)، نمونه برداری کرده، پس از تهیه‌ی رقت‌های متوالی از نمونه‌های مختلف، کشت در محیط لیستریا سلکتیو آگار، (Listera Selective Agar) به صورت سطحی انجام شد. نمونه‌ها به مدت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، گرمخانه‌گذاری شد. کلنی‌های جدا شده از نظر رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های اولیه کاتالاز و اکسیداز و تست‌های بیوشیمیایی هیدرولیز اسکولین، ذوب ژلاتین، تست کمپ و تخمیر قندهای مانیتول، رامنوز، گزیلوز مورد آزمایش قرار گرفته، در نهایت تعداد باکتری‌های جدا شده در هر گرم از ماهی، مورد محاسبه قرار گرفتند(۱۳).

۲-۲-تجزیه و تحلیل آماری

به منظور ارزیابی اختلاف معنی دار بین مقادیر حاصل از هر یک از شاخص‌ها در ماهی تازه، ماهی شکم پر و شکم خالی دودی شده در طی ۳ روز از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. جهت تعیین دقیق وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین شاخص‌ها درتیمارهای مذکور از آزمون T-Test استفاده گردید.

۳-نتایج و بحث

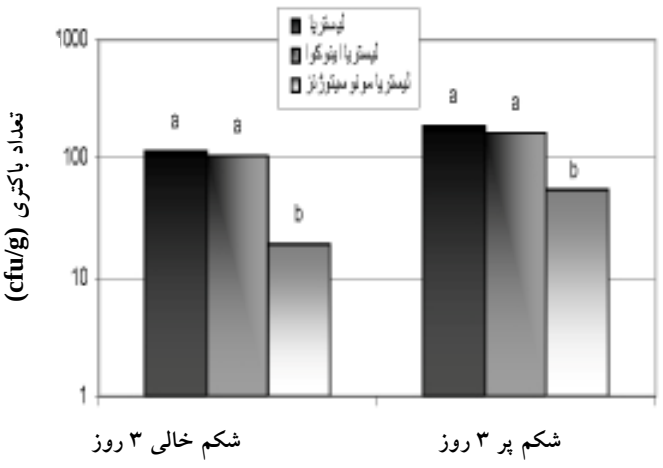
از ۱۵ قطعه فیتوفاگ شکم پر ۳ روز دودی داده شده، ۱۲عدد به لیستریا آلوده بوده که از این تعداد هر ۱۲ نمونه (۱۰۰ درصد) به لیستریا اینوکوآ و٦ نمونه (۵۰ درصد) به لیستریا مونوسیتوژنز آلوده بودند(جدول و نمودار۱). تعداد دو گونه در این تیمار، معنی دار بوده است($p<0.05$). از ۱۵ ماهی فیتوفاگ شکم خالی ۳ روز دود داده شده، ۵ نمونه (۳۳/۳ درصد) به لیستریا آلوده بوده که از این تعداد هر ۵ نمونه به لیستریا اینوکوا و ۳ نمونه به لیستریا مونوسیتوژنز آلوده بودند (جدول ۲، نمودار ۱). اختلاف معنی داری بین دو گونه جداشده در این تیمار، وجود داشته است($p<0.05$).

جدول۱- وضعیت آلودگی ماهیان شکم پر ۳ روز دود داده شده به لیستریا اینوکوا و مونوسیتوژنز

نمونه‌ی ماهی	تعداد باکتری (cfu/g)	
	لیستریا اینوکوآ	لیستریا مونوسیتوژنز
۱	۱۳۹/٦±۱/۵۲	۰
۲	۰	۰
۳	۱۰۰/۳±۰/۵۸	۲۱±۱
٤	۱۷۹/۳±۱/۱۵	۰
۵	۱۰۹/۷±۰/۵۷	٤۹±۱
٦	۹۹/۳±۰/۵۸	۰
۷	۲۲۰±۰	٦۹±۱
۸	۰	۰
۹	۱۲۰±۱	۰
۱۰	۱۷۹/۷±۰/۵۷	۰
۱۱	۹۹/۷±۰/۵۷	۲۰/۳±۰/۵۷
۱۲	۰	۰
۱۳	۲۱۹/۷±۰/۵۷	۰
۱٤	۲۷۹/۳±۰/۵۷	۱۲۰/۳±۰/۵۷
۱۵	۲۱۰/٦±۰/۵۷	۵۰/۳±۰/۵۷

جدول۲ - وضعیت آلودگی ماهیان شکم خالی۳ روز دود داده شده به لیستریا اینوکوا و مونوسیتوژنز

ردیف	تعداد باکتری(cfu/g)	
	لیستریا اینوکوآ	لیستریا مونوسیتوژنز
۱	۰	۰
۲	۰	۰
۳	۰	۰
٤	۱۷/۷±۰/۵۷	۱/۷±۰/۵۷
۵	۰	۰
٦	۲۰/۷±۱/۱۵	۰
۷	۰	۰
۸	۰	۰
۹	۱۵±۱	۵
۱۰	۰	۰
۱۱	۰	۰
۱۲	۰	۰
۱۳	٤۵۰/۳±۰/۵۷	۵۰/۳±۰/۵۷
۱٤	۰	۰
۱۵	۲۰	۰



شکل ۱: مقایسه‌ی میانگین تعداد دوگونه از لیستریا در ماهی فیتوفاگ شکم خالی و شکم پر ۳ روز دود داده شده

از نظر تعداد کل باکتری لیستریا و هم‌چنین از نظر لیستریا اینوکوا و مونوسیتوژنز بین فیتوفاگ شکم خالی و شکم پر۳ روز دود داده شده، اختلاف معنی‌داری وجود دارد($p<0.05$).

در این تحقیق، ماهیان به دو صورت شکم پر و شکم خالی، دودی گردیدند که سهم آلودگی ماهیان شکم پر به لیستریا ۸۰ درصد و درصد آلودگی ماهیان شکم خالی به لیستریا ٥٤ درصد بود. این موضوع، حاکی از تاثیر تخلیه‌ی شکمی بر آلودگی به لیستریا است. دلیل احتمالی آلودگی نمونه‌ها به هر دو گونه باکتری در تیمار شکم پر وجود امعاء و احشا باشد(۱۲,۱۵). در واقع لیستریا از محیط‌های آب، خاک، حیوانات، گیاهان، فاضلاب و لجن منشاء می‌گیرد و باعث آلودگی می گردد(٤, ۱۰، ۱۱). لیستریا درمحیط‌هایی چون لجن کف دریاچه‌ها و محیط‌های نزدیک ساحل بیش تر دیده شده که این آلودگی به پوست و محتویات روده‌ی ماهی منتقل می‌شود و باعث آلودگی دوباره‌ی آب می شود (١٤ و ۲۰). این روند در ماهیان پرورشی بیش تر دیده می‌شود(۱). به هنگام نگه داری ماهی دودی در دمای محیط، پتانسیل آلودگی آن به باکتری‌های مزوفیل و سرماگرای مولد فساد از جمله لیستریا افزایش می‌یابد(۱۰). لیستریا مونوسیتوژنز(*L.monocytogenes*) و دیگر گونه‌های لیستریا در محصولات دریایی از دهه‌ی ۱۹۹۰ تا به حال دیده شده است. Embark در سال ۱۹۹۹ لیستریا(*Listeria*) را به طور گسترده در غذاهای دریایی مشاهده نمود و دریافت که لیستریا مونوسیتوژنز(*L.monocytogenes*) از ٤ تا ۱۲ ٪ در دماهای مختلف گسترش دارد. در مطالعه‌ی Parihar و همکاران در سال ۲۰۰۹ از ۱۱۵ نمونه، ۲۸ نمونه به گونه‌های لیستریا آلوده بودند. Jeyasekaran و همکاران در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که ۱۲/۱ ٪ فرآورده‌ها در نرمتنان و ۱۷/۲ ٪ در ماهیان استخوانی مناطق گرمسیر در هند آلوده به این باکتری می‌باشد. Dhanashree, *et al* در سال ۲۰۰۸، نشان دادند که نمونه‌های ماهی قزل آلای تازه در حدود ۳۰/۸٪ به *لیستریا اینوکا* (*L.innocua*) و۱/۳٪ به لیستریا مونوسیتوژنز (*L.monocytogenes*) آلوده بودند. دیگر مطالعات، گسترش لیستریا مونوسیتوژنز (*L.monocytogenes*) را در قزل آلا به نسبت از ۲تا ٥ درصد نشان می‌دهد(Autio, *et al*., 2004). Hartemink و Georgsson در سال ۲۰۰٥، نشان داد که ٥٦٪ از ماهیان آب شیرین فروخته شده در بازار به لیستریا مونوسیتوژنز(*L.monocytogenes*) و دیگر گونه‌های آن، آلوده بودند. شیوع بالای ۳٪ از لیستریا مونوسیتوژنز (*L.monocytogenes*) در ماهیان اروپائی دیده شد(et al., Davies 2009). لیستریا مونوسیتوژنز (*L.monocytogenes*) به عنوان یک باکتری سرما دوست بررسی شده و ممکن است در آب‌های گرمسیر کم تر وجود داشته باشد. حضور *لیستریا اینوکا* (*L.innocua*) در ماهیان گرمسیری در مطالعات Dhanashree و همکاران در سال ۲۰۰۸ و Laciar در سال ۲۰۰۹ دیده شد. غذاهای حاصله از قزل آلا و محصولات آن به *لیستریا اینوکا*(*L.innocua*) آلوده بودند واین میزان نسبت به لیستریا مونوسیتوژنز(*L.monocytogenes*) بیش‌تر بود.آلودگی ممکن است در اثر دستکاری از زمان صید تا کارخانه و یا در مرحله‌ی پروسه فرآوری در کارخانه باشد. منابع آلودگی از آب و یخ، منبع نمک و جعبه و یا انسان باشد. لیستریا مونوسیتوژنز (*L.monocytogenes*) به طور مرسوم در آب‌های ساحلی، آب سطحی دریاچه و پرورش ماهی وجود دارد(FAO,1999). اطلاعات کمی در مورد پتانسیل آلودگی ماهی و محصولات آن لیستریا وجود دارد. در محصولاتی که در جعبه‌ی یخ برای فروش بسته بندی می‌شوند، امکان آلودگی به لیستریا مونوسیتوژنز(*L.monocytogenes*) بیش تر است.در آن‌ها ماده‌ی خام در ابتدا فاقد آلودگی بوده اما به علت دستکاری در طول مراحل فرآوری، محصولات غذایی غیر قابل مصرف می‌گردد(Autio, et al., 2004). نتایج تحقیقات Guyer در سال ۲۰۰٦ نشان داد که با افزایش زمان نگه داری ماهی دودی، روند آلودگی آن به لیستریا به طور معنی داری افزایش یافته که این امر خطر افزایش انتقال آلودگی به مصرف کننده را در پی خواهد داشت(۲۰). نتایج تحقیقات Rorvik و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان داد که خالی کردن محتویات شکمی و استفاده از تجهیزات ماشینی در مرحله‌ی نمک زنی، آلودگی ماهی به میکروارگانیسم‌های مولد فساد و بیماری را کاهش می‌دهد. ماهیان مختلف در مناطق متفاوت به دو صورت سنتی و صنعتی دودی می‌گردند که در روش سنتی ماهیان بیش‌تر به صورت شکم پر دودی شده ولی در روش صنعتی پس از خالی کردن امعاء و احشاء ماهی, دود دهی انجام می‌گیرد(۲ و ٤).

٤- نتیجه گیری

در بررسی تیمار شکم پر و شکم خالی، مشخص شد کـه تعـداد باکتری به طور معنی‌داری در ماهیان شکم پر بیش‌تر بوده اسـت. لذا از حیث آلودگی لیستریا استفاده از گونه‌های تازه بـا حـداقل آلودگی، شکم خالی بودن نمونـه‌هـا معقولانـه و اجتنـاب‌ناپـذیر می‌باشد.

٥- منابع

١- تبریزی، م. ١٣٦٨. مجموعه مقالات دودی کردن ماهی، انتـشارات طرح و برنامه شیلات، ص ٩٤.

٢- شهراسـبی، ح. و ناصـری، ع. ١٣٦٤. ارزش غـذایی و روش‌هـای عملی کنترل بهداشتی و شیمیایی بعضی از فرآورده‌های گوشتی ایـران، انتشارات جهاد دانشگاهی، ص ٣١٩-٢٣١ .

٣- صـفری، ر. و نیرانـی، م. ١٣٧٧. بررسـی شـیوع لیـستریوز در فرآورده‌های دریائی انتشارات مرکز تحقیقات شیلات استان مازنـدران، ص ٨ .

4- Allerberger, F. and Guggenbichler, J. P. 1999. Listeriosis in Austria: Report of an outbreak in 1986. *Acta Microbiologica Hungarica* 36:149-152.

5- Autio, T., Hielm, S., Miettinen, M., Sjoberg, A. M., Aarnisalo, K., Bjokroth, J., 2004. Sources of *L. monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 150-155.

6- Bell,C and A,Kyriakides. 2005. Listeria, A practical approach to the organism and its control in foods, 2th, Blackwell publishing.

7- Curtis, G.D.W., R.G. Mitchell, A.F. King, and J. Emma. 2000. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Microbiol*. 8, 95-98.

8- Dhanashree, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., Goebel, W., & Karunasagar, I.2008. Incidence of *listeria spp.* In clinical and food samoles in Mangalor, India. *Food Microbiology*, 20, 447-453.

9- Dillon , R . T. Patel , 2003. Effect of cold smoking and storagetemperature on *Listeria monocitogenes* in saefoods .I*nternational Journal of Food Microbiology* .62, 267-274

6-Embarek P.K. B: Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. 1999. *Journal of Food Microbiol*.23, 17-34.

10- Dillon, R., T. Patel, and S. Ratnam. 2003. Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products. *International Journal of Food Microbiology*. 22:73-77

11- Farber, J. M. 2000b. *Listeria monocytogenes* in fish products. *Journal of Food Protection.* 54: 922-924, 934.

12- FAO,1999. Fisheries Report No. 604. Expert consulation on the trade impact of *listeria* in fish products. Amherst, MA, USA.

13- Goulet, V., J. Rocourt, I. Rebiere, C. Jacquet, C. Moyse, P. Dehaumont, G. Salvat, and P. Veit. 2002. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *Journal of Infectious Disease.* 177, 155-160

14- Gram, L., 2004,How to meet an FSO-Control of *Listeria monocytogenes* in smokked fish industry *Journal of Food Microbiology* ,95:59-67

15- Guyer,S and T .jemmi , 2006. Behavior of *Listeria monocytogenes* during incubatiob and storage of exermentally contaminated smokedalmon. *Appl. Environ. Microbiol* .57,1523-1527.

16- Hertemink, R. and Georgsson, F.2005.Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 189-195.

17- Jeyaesekaran, G., Karunasagar, I. and Karunasagar, I.2009. Incidence of *listeria* spp. In tropical fish. *International Journal of Food Microbiology*, 31,333-340.

18- Laciar, A. L. and de Centorbi, O. N. P. 2009. Listeria species in seafood: Isolation and characterization of *Listeria* spp. From seafood in San Luis, Argentina. *Food Microbiology*, 19, 645-651.

19- Maefadding, J.F. 2004. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3th ed, Lippincott Williams & Wilkins

20- Marrakchi, A., A. Hamama, and F. el Othmani. 1999. Occurence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. *Journal of Food Protection* .56, 256-259.

21- Parihar, V.,S. Barbuddhe, S, B., Danielsson, M, L,. Tham, W., 2009 Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control*. 19.566-569.

22- Ryser, E. T. 2001a. Foodborne listeriosis, Pages 299-358 *in* E. T. Ryser and E. H. Marth, eds. Listeria, Listeriosis, and Food Safety. Food Science and Technology. New York, Marcell Dekker, Inc.

23- Tina,M,1999. Source of *liseria monocytogenes* contamination in cold -smoked Rainbow trout processing plant detected by : pulsed–field Gel Electrophoresis typing. Applied and Environment Microbiology 56,155-160.

24- Vanderzant, C. and D.F.Splittstoesser, 1999. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association. Washington

25- Varnam . A.H, M.G. Evans, 1999. Foodborne pathogenes . Wolf publishing Ltd.