



Identification of Hidden Microbial Agents in Broiler Chickens Using Molecular and Chemical Techniques: A Novel Approach to Food Safety Management

Fatemeh Khakinahad¹, Nima Bahador^{1*}

¹ Department of Microbiology, Shi.C., Islamic Azad University, Shiraz, Iran

Received Date:2025.03.23 Accepted Date:2025.09.25

Abstract

Microbial contamination of poultry carcasses represents a major challenge in food safety. The presence of viable but non-culturable (VBNC) pathogens in meat products—due to their resistance to environmental stressors—poses a potential threat to public health. Detection of these bacteria through culture-independent methods plays a crucial role in food safety monitoring. This study aimed to identify both culturable and non-culturable bacterial strains in packaged and unpackaged chicken meat sold in Bavanat County, using classical and molecular techniques, with a focus on stress-related genes RpoS and OxyR. A total of 100 fresh and frozen chicken samples from various brands were collected. Bacterial isolation was performed using selective media and biochemical tests. Genomic DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) were conducted using universal 16S rRNA primers and specific primers targeting the stress-related genes. PCR products were analysed via agarose gel electrophoresis and DNA sequencing. The results revealed that *Escherichia coli* (20%) and *Staphylococcus* spp. (16%) were the most prevalent Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. Non-culturable isolates included *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, and *Acinetobacter*. The presence of RpoS and OxyR genes in some isolates confirmed their ability to enter the VBNC state and resist stressful conditions. These findings indicate that chicken meat sold in Bavanat harbours a diverse range of pathogenic bacteria, which may pose a serious risk to consumer health. The identification of VBNC strains and stress-related genes underscores the importance of employing culture-independent methods in poultry meat safety surveillance.

Keywords: Chicken, non-culturable bacteria, culturable bacteria, polymerase chain reaction, OxyR, RpoS.

* ni.bahador@iau.ac.ir

EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Poultry serves as a significant reservoir for microorganisms that can be transmitted between humans and livestock, potentially impacting public health. One effective strategy to mitigate bacterial pathogens in humans is to monitor the microbial quality of poultry meat. Moreover, in response to environmental stressors, many bacteria enter a viable but non-culturable (VBNC) state as an adaptive mechanism. The physiological behaviour of such bacteria can be characterised by identifying specific genes, notably *RpoS* and *oxyR*. Accordingly, this study aimed to investigate the prevalence of culturable and VBNC bacteria in various types of poultry meat.

Materials and Methods: A total of 100 samples of fresh and frozen chicken from various brands in the Bavanat region were analysed over six months. Samples were collected using washing, swabbing, and tissue chip techniques. Nutrient broth and Gram-negative broth media were employed for enrichment. Given the potential for certain strains to exist in a VBNC state, selective and differential media were used for preliminary identification, followed by molecular techniques targeting specific genes. To detect *Listeria*, samples in broth media were incubated for 72 hours at 4°C. Subsequently, cultures were streaked onto Palcam agar and incubated under defined conditions. Colonies, particularly those on blood agar, were purified and identified using Gram staining, catalase, oxidase, and coagulase tests. Further biochemical assays were conducted to differentiate Gram-positive and Gram-negative isolates, and molecular tests were performed after removing duplicate strains. Due to the lower yield of culturable bacteria from chicken washing water compared to stomach contents and solid tissues, three post-slaughter washing water samples were used to assess VBNC bacterial load. Identification of VBNC strains was conducted via PCR targeting *RpoS* and *oxyR* genes.

Results: Biochemical testing and ABIS Encyclopedia software analysis revealed *Escherichia coli* as the most prevalent Gram-negative bacterium (20%), while *Staphylococcus* was the most common Gram-positive isolate (16%). Other Gram-negative genera included *Klebsiella*, *Shigella*, *Chlorella*, *Proteus*, *Enterobacter*, and *Pseudomonas*. Among Gram-positive bacteria, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, and *Bacillus* were also identified. Molecular analysis confirmed the presence of culturable strains such as *E. coli*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, and *Enterococcus*. Two isolates remained unidentified by software. VBNC strains identified included *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, and *Acinetobacter*.

Discussion: Twenty-five morphologically distinct strains were identified: 15 Gram-negative and 10 Gram-positive. *E. coli* was the most frequent Gram-negative isolate (20%), and *Staphylococcus aureus* was the most common Gram-positive (16%). Of the 25 isolates, only three contained *RpoS* and two contained *oxyR* genes. No *Listeria* species were detected, possibly due to sample size, type, or collection method. The presence of *E. coli* suggests inadequate sanitary control in the study area. Tissue swabs and scrapings proved more effective than washing water for bacterial isolation. PCR analysis of 25 samples revealed three Gram-positive isolates (*S. aureus*, *Enterococcus*, *Psychrobacter*) and several Gram-negative genera including *E. coli*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Proteus*, and *Aeromonas*. Sixteen of the 23 samples tested showed consistent results across both biochemical and molecular methods. Contamination was predominantly due to Gram-negative bacteria, typically transmitted via the faecal-oral route. This implies potential issues with intestinal evacuation, washing systems, or processing channels. Factors such as transport duration, basket handling, and slaughtering procedures may also contribute to contamination. PCR results showed that *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* isolates carried the *RpoS* gene (251 bp band), while *Pseudomonas* and *Psychrobacter* also carried the *oxyR* gene (572 bp band).

Conclusion: Detection of VBNC organisms in food is crucial for public health, as these bacteria may be pathogenic. Molecular techniques targeting specific genes are recommended for identifying such organisms in food products. Additionally, this study highlights the importance of evaluating washing machinery, personnel hygiene, and processing protocols to reduce foodborne pathogenic risks.



شناسایی باکتری‌های قابل کشت و غیر قابل کشت در مرغ‌های گوشتی با بهره‌گیری از روش‌های شیمیایی و مولکولی: رویکردی نوین در مدیریت ایمنی غذایی

فاطمه خاکی نهاد^۱، نیما بهادر^{۱*}

^۱ گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۳

چکیده

آلودگی میکروبی لاشه طیور یکی از چالش‌های اساسی در ایمنی مواد غذایی است. حضور باکتری‌های بیماری‌زای غیر قابل کشت در محصولات گوشتی، به دلیل مقاومت در برابر شرایط استرس‌زا، خطر بالقوه‌ای برای سلامت عمومی دارد. شناسایی این باکتری‌ها با روش‌های مستقل از کشت، نقش مهمی در پایش ایمنی مواد غذایی دارد. این مطالعه باهدف شناسایی سویه‌های باکتریایی قابل کشت و غیر قابل کشت در گوشت مرغ بسته‌بندی شده و غیر بسته‌بندی شده عرضه شده در شهرستان بوانات، با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی، با تمرکز بر ژن‌های مرتبط با استرس محیطی *RpoS* و *OxyR* بود. در این پژوهش ۱۰۰ نمونه مرغ تازه و منجمد از برندهای مختلف جمع‌آوری شد. جداسازی باکتری‌ها با محیط‌های کشت اختصاصی و آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفت. استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمر سال ۱۶S rRNA و پرایمرهای اختصاصی ژن‌های هدف انجام گرفت. محصولات حاصل با الکتروفورز ژل آگارز و تعیین توالی DNA بررسی شدند. نتایج نشان داد /شیریشیا کولی (۲۰ درصد) و استافیلوکوکوس (۱۶ درصد) به ترتیب شایع‌ترین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بودند. جدایه‌های غیر قابل کشت شامل *پزودوموناس*، *سایکروباکتر* و *اسیتوباکتر* بود. حضور ژن‌های *RpoS* و *OxyR* در برخی جدایه‌ها تأیید شد که نشان‌دهنده توانایی آن‌ها در ورود به مرحله غیر قابل کشت و مقاومت در برابر شرایط استرس‌زا بود. نتایج حاصل بیان‌کننده این است که گوشت مرغ عرضه شده در منطقه بوانات دارای تنوع بالایی از باکتری‌های بیماری‌زا است که می‌تواند تهدیدی جدی برای سلامت مصرف‌کنندگان باشد. شناسایی سویه‌های غیر قابل کشت و ژن‌های مرتبط با استرس، ضرورت استفاده از روش‌های مستقل از کشت را در پایش ایمنی گوشت طیور برجسته می‌سازد.

کلید واژه ها : مرغ، باکتری‌های غیر قابل کشت، باکتری‌های قابل کشت، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، *RpoS* و *OxyR*

* ni.bahador@iau.ac.ir

مواد غذایی زندگی کند و انواع گوشت‌های فرآوری شده را آلوده نماید (۷). آلودگی گوشت طیور توسط لیستریا مونوسیژنزا^۱ اغلب با مراحل کشتار و فرآوری مرتبط بوده است. علاوه بر این، برخی از شرایط محیطی (مانند رطوبت و دما) می‌تواند به ماندگاری میکروارگانیسم در صنعت فرآوری طیور کمک کند (۸). در واقع وقوع این پاتوژن اغلب با محیط کشتارگاه مرتبط است تا تولید اولیه از طریق حیوانات ناقل. با این حال، برخی از مطالعات بروز پاتوژن را در حیوانات زنده و در سطح مزرعه نیز گزارش کرده‌اند، به طوری که لیستریا مونوسیژنزا جدا شده از مدفوع پرندگان قادر است عفونت را به حیوانات اهلی و نشخوارکنندگان منتقل کند (۹، ۱۰).

هم‌چنین در ارتباط با پاسخ بسیاری از باکتری‌ها به استرس‌های متفاوت محیطی و وارد شدن آن‌ها به مرحله فیزیولوژیکی جدید، تحقیقاتی بر روی برخی از ژن‌های باکتری‌ها انجام گرفته است. سلول‌های زنده اما غیر قابل کشت (VBNC)^۲ باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت یکی از این پاسخ‌ها است (۱۱). VBNC به عنوان یک مکانیسم تطبیقی برای سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط استرس‌زا تعریف می‌شود. اگرچه باکتری‌های زنده از نظر متابولیسمی فعال هستند، اما قادر به رشد در محیط‌های کشت معمولی نیستند. با این وجود، ظرفیت بالقوه پاتوژن‌ها برای حفظ فعالیت حدت و احیای بیشتر به حالت کشت در شرایط مطلوب، یک خطر بزرگ برای ایمنی مواد غذایی و سلامت عمومی است. فرآوری، تبدیل و ذخیره‌سازی مواد غذایی، و هم‌چنین تکنیک‌های غیرحرارتی، می‌توانند پاتوژن‌ها را به سمت القای پاتوژن تحریک کنند. بنابراین ویژگی متمایز باکتری منجر به ظهور تکنیک‌های جدید مستقل از کشت برای جلوگیری از تفسیر نادرست ایمنی مواد غذایی شد (۱۲). از طرف دیگر از آنجایی که کمپیلوباکتریوز نیز در انسان یک نگرانی جهانی است و میزان شیوع بالای آن در مخزن طیور مهم‌ترین منبع عفونت در نظر گرفته می‌شود. یافته‌های تحقیقاتی نشان می‌دهد که کمپیلوباکترها توانایی وارد شدن به یک حالت

مقدمه

آلودگی لاشه طیور با میکروارگانیسم‌های پاتوژن از دو منبع اصلی محیط کشتارگاه (فرایند، تجهیزات، دست‌کارگران) و پرنده زنده (محتویات مجرای گوارشی، آلودگی پوست و غیره) نشأت می‌گیرد (۱). در صورت عدم رعایت موازین بهداشتی، کشتارگاه طیور می‌تواند در ایجاد و گسترش آلودگی لاشه‌ها تاثیر به‌سزایی داشته باشد (۲). امروزه صنعت غذا بخش قابل توجهی از منابع مالی خود را برای اطمینان از کیفیت بهداشتی محصولات خود سرمایه‌گذاری می‌کند که این به دلیل ضررهای اقتصادی ناشی از فساد میکروبی مواد غذایی و هم‌چنین ظهور بیماری‌های غذازاد در مصرف‌کنندگان می‌باشد (۳). یکی از راه‌های کاهش عوامل باکتریایی بیماری‌زا برای انسان پایش کیفیت میکروبی گوشت طیور در طول تولید، نگهداری و توزیع است (۴). علاوه بر این، آلودگی پس از فرآیند محصولات غذایی مبتنی بر عضله، در صورتی که آلوده به میکروب باشد خطرناک و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بنابراین، کنترل این میکروب‌ها در بسته‌های محصول به مدت طولانی، بسیار مهم است. تکنولوژی بسته‌بندی در حال حاضر با انواع فرآیندهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی همکاری می‌کند تا مواد غذایی را حفظ و از رشد و انتقال میکروارگانیسم‌های مرتبط جلوگیری کند (۵، ۶). از آنجایی که طیور مخزن میکروارگانیسم‌های مشترک بین انسان و دام، مانند کمپیلوباکتر، سالمونلا، اشریشیا کلی و لیستریا می‌باشد نقش بسیار زیادی بر سلامت انسان دارد. در بین جدایه‌های مذکور لیستریا یکی از جنس‌های باکتریایی است که در خاک، آب و برخی حیوانات از جمله طیور و گاو یافت می‌شود. این باکتری می‌تواند در شیر خام و غذاهای تهیه شده از شیر خام وجود داشته باشد. هم‌چنین می‌تواند در کارخانه‌های فرآوری

² Viable but non-culturable state

¹ *L. monocytogenes*

ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور با استفاده از روش‌های شستشو، سواب و نیز تراشه‌های بافتی، به تفکیک از هر کدام ۱۰ نمونه تهیه گردید و در ظرف‌های جدا و استریل با برچسب‌های مشخص از طریق چرخه سرمایی به آزمایشگاه منتقل گردید (۱۷). در آزمایشگاه در شرایط کاملاً استریل و زیر هود قطعات جامد مانند جگر، بخش‌های گوشتی مانند ران و سینه به قطعاتی با وزن ۱۰g بریده شد. جهت غنی‌سازی از محیط‌های کشت نوترینت براث و گرم نگاتیو براث استفاده گردید. به این ترتیب که از نمونه‌های مایع تهیه شده توسط پیپت مدرج مقدار ۰/۵ ml به محیط کشت‌های نوترینت براث و گرم نگاتیو براث تلقیح شد و به صورت چمنی کشت داده شد. همچنین قطعات گوشتی جدا شده به وزن ۱۰g در ۱۰ ml محیط فوق به تفکیک اضافه گردید و به مدت ۷۲h در دمای ۳۷°C در انکوباتور قرار داده شد (۱۸). با توجه به این که سویه‌هایی که توانایی ورود به مرحله VBNC را دارند در گروه باکتری‌های پاتوژن می‌باشند بنابراین از محیط‌های کشت اختصاصی و تمایزی جهت شناسایی اولیه باکتری‌ها استفاده و سپس تکنیک‌های مولکولی بر اساس ژن‌های مورد نظر انجام شد. برای جداسازی اولیه از مانتول سالت آگار، سالمونلا شینگلا آگار، ائوزین متیلن بلو، اسکیرو^۳ و بلاد آگار استفاده گردید (۱۶، ۱۹، ۲۰). بدین منظور توسط لوپ استریل به روش کشت ایزوله (خطی)، محیط‌های کشت غنی که کدورت نشان دادند انتخاب و بر روی محیط‌های اشاره شده در بخش فوق کشت و کدگذاری شدند. سپس به مدت ۴۸-۲۴ h در دمای ۳۷°C انکوبه شد. از آنجایی که امروزه لیستریا به عنوان یکی از باکتری‌های شایع و عوامل مهم در بخش صنایع غذایی به حساب می‌آید بنابراین در مرحله بعد لوله‌های حاوی محیط‌های کشت براث و نمونه‌ها به مدت ۷۲h در دمای ۴°C نگهداری شدند. بعد از گذشت سه روز از محیط‌های نوترینت براث و گرم نگاتیو براث توسط لوپ به روش کشت خطی بر روی محیط پالکام آگار^۴

VBNC را دارند، و هم‌چنان «قابل حیات» هستند اما قادر به رشد در محیط‌های کشت نیستند (۱۳). با شناسایی ژن‌هایی خاص می‌توان پاسخ‌های فیزیولوژیکی این نوع از باکتری‌ها را تعیین نمود. یکی از ژن‌های دخیل در این شرایط، ژن *RpoS* تنظیم‌کننده اصلی استرس و ژن دیگر *oxyR* است که تنظیم‌کننده *katG* است (۱۴، ۱۵). گونه‌های *پزودوموناس*، *انتروباکتریاسه* و باکتری‌های اسید لاکتیک مانند گونه‌های کارنوباکتریوم^۱ و لاکتوباسیل‌ها، در میان اغلب آلودگی‌های باکتریایی گزارش شده‌اند. اکثریت قریب به اتفاق نتایج منتشر شده بر روی باکتری‌های بیماری‌زا متمرکز شده در حالی که میکروارگانیزم‌های دیگر به ندرت مورد بررسی قرار گرفته‌اند. شیوع *سالمونلا* و *کمپیلوباکتر*، و یا خصوصیات جدایی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* از برش‌های مرغ در چندین کشور گزارش شده است (۱۶). از آنجایی که فرارونده‌های گوشتی در انتقال باکتری‌ها به خصوص باکتری‌های زئونوز^۲ به انسان نقش مهمی دارد و تنها تعداد کمی از مطالعات اختصاص به کل میکروبیولوژی گوشت مرغ داشته است، بنابراین در تحقیق حاضر بر آن شدیم تا شایع‌ترین باکتری‌های قابل کشت و غیر قابل کشت، که متنوع بوده و نیز بخش مهمی از آنان به عنوان باکتری‌های پاتوژن به‌شمار می‌آیند و در انتقال به انسان نقش به‌سزایی دارند، در گوشت مرغ عرضه شده به صورت بسته بندی و غیر بسته بندی در خرده فروشی‌ها و کشتارگاه‌های شهرستان بوانات با استفاده از روش‌های شیمیایی و مولکولی با کمک توالی پرایمر یونیورسال و ژن‌های استرس محیطی موثر در این گروه مورد بررسی قرار داده شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی باکتری‌ها

در این تحقیق ۱۰۰ نمونه مختلف مرغ به صورت تازه و منجمد با برندهای مختلف در منطقه بوانات مورد

¹ *Carnobacterium*

² Zoonosis

³ Mannitol salt agar (MSA), *Salmonella Shigella*, Eosin Methylene Blue Agar, AgarSkirrow

4 Palcam agar

کشت داده شد (۲۱). محیط های کشت به مدت ۴۸-۲۴ h در دمای ۳۷°C انکوبه شدند. سپس کلنی های خالص از نظر مورفولوژی و با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند (۲۲, ۲۳). بعد از اتمام مدت زمان انکوباسیون، پلیت های کشت داده شده مورد بررسی قرار گرفت و با توجه به تنوع کلنی ها بخصوص بر روی بلاد آگار جدایه ها مجدداً خالص سازی به مدت ۴۸-۲۴ h در دمای ۳۷°C انکوبه گردید. کلنی هایی که از نظر مورفولوژی، قوام و رنگ متفاوت بودند پس از خالص سازی جهت شناسایی اولیه مورد استفاده قرار گرفتند و بر اساس آزمون های رنگ آمیزی گرم، کاتالاز، اکسیداز و کوآگولاز مورد شناسایی قرار گرفتند.

شناسایی جدایه ها به کمک تست های بیوشیمیایی

در این مرحله برای هر گروه از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی به تفکیک تست های بیوشیمیایی خاص انجام گرفت. برای باکتری های گرم منفی، جدایه ها در محیط های کشت سه قندی آهن دار^۱، محیط سولفید ایندول موتیلیتی^۲، سیمون سترات آگار^۳، متیل رد، ووژ پروسکوایر براث^۴ تلقیح گردید و جهت شناسایی باکتری های گرم مثبت از آزمون های کشت در محیط DNase، کشت در محیط آمیلاز، کشت در محیط ژلاتین و تست احیاء نترات استفاده گردید (۲۲ و ۲۳).

استخراج DNA ژنومی در باکتری های قابل کشت

جدول ۱. توالی پرایمر یونیورسال ۱۶S rRNA (۲۴)

Primers	Sequence (5' to 3')	Product length
F	TACGGTTACCTTGTTACGACTT	1506bp
R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	

باتوجه به آزمایشات بیوشیمیایی، با حذف موارد تکراری تعداد ۲۰ محیط کشت از باکتری های رشد کرده انتخاب و جهت انجام آزمایشات مولکولی استفاده شدند. استخراج DNA ژنومی ایزوله ها با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت سیناژن انجام گرفت. در این مرحله محلول خالص DNA بدست آمد. ۶۰ μL از آن در دمای ۲۰°C - نگهداری شد تا برای PCR مورد استفاده قرار گیرد (۲۴).

انجام مراحل PCR

در این تحقیق به دلیل مشخص نبودن دقیق جنس و گونه باکتری ها از پرایمر یونیورسال شرکت ماکروژن استفاده شد. آزمایش PCR در مخلوط واکنشی به حجم ۵۰ μL صورت گرفت. جهت تکثیر ژن ۱۶S rRNA از آغاز گرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد. معرف های مخلوط اصلی PCR به شرح زیر بود: ۵ μL بافر (۱۰X)، ۴ μL MgCl₂، ۲ μL dNTP، ۲۰۰ μm/L پرایمر، ۱-۲ μm/L DNA پلیمرز Taq، ۲ μL الگوی DNA و ۳۱/۶ μL dH₂O. فرآیند PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر، با چرخه پیش دناتوراسیون ۹۴ °C به مدت ۱ min دقیقه و پس از آن مرحله تکثیر DNA با ۳۰ چرخه (۹۴ °C به مدت ۳۰ s، ۵۸ °C به مدت ۱۵ s و ۷۲ °C به مدت ۲۵ s) و سپس چرخه نهایی تکثیر ۷۲ °C به مدت ۲ min انجام شد (۲۴).

به منظور انجام الکتروفورز بر روی نمونه های مورد مطالعه ژل آگارز ۲ درصد در بافر TBE تهیه شد. ۰/۸ گرم آگارز با

آنالیز کیفی محصولات PCR

³ Simmons Citrate Agar
⁴ Vegesproskare Broth

¹ Triple sugar Iron Agar
² Sulfide-Indol-Motility (SIM)

از آنجایی که در مرحله کشت و تشخیص بیوشیمیایی تعداد باکتری‌های قابل کشت جداسازی شده از نمونه‌های آب شستشوی مرغ‌ها کمتر از محتویات داخل شکم و قطعات جامد مرغ‌ها بود، بنابراین در این مرحله سه نمونه از آب شستشوی بعد از کشتار مرغ جهت تعیین بار میکروبی باکتری‌های غیرقابل کشت استفاده گردید.

آزمایش مولکولی PCR جهت استخراج دو ژن اختصاصی *OxyR* و *RpoS*

در این مطالعه استخراج DNA باکتری بر اساس توضیحات فوق انجام و محلول حاوی DNA جهت آزمون واکنش زنجیره ایی پلی مرز مورد استفاده قرار گرفت. جدول شماره ۲ پرایمرهای مورد نیاز برای ژن‌های مورد ردیابی را نشان می‌دهد. پس از PCR محصول الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۲ درصد انتقال یافت.

۴۰CC بافر XTBE^۱ تهیه و در دمای °C ۵۰-۶۰، ۳ μL DNA Safe Stain با غلظت ۱۰ mg/μl به آن افزوده و در داخل قالب ژل ریخته و بعد از تنظیم و سرد شدن و بستن ژل قالب درون تانک حاوی بافر XTBE^۱ قرار داده شد. سپس نمونه‌ها درون چاهک‌ها ریخته شد. در اولین چاهک نیز از DNA Ladder مناسب استفاده گردید. به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۷۰V نمونه‌ها الکتروفورز شدند و موقعیت باندها توسط عکس‌برداری UV ترانس لومیناتور زیر اشعه ایکس مورد بررسی قرار گرفت. سپس جهت تعیین توالی DNA، ۲۰ μL از محصول PCR به همراه پرایمر فرورارد برای تعیین توالی جهت شناسایی مولکولی بر اساس SrRNA^{۱۶} به شرکت ماکروژن کره ارسال شد.

شناسایی سویه‌های غیرقابل کشت بر اساس آزمون PCR

جدول ۲. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های *OxyR* و *RpoS* (۳۱-۳۳)

ژن	Primers	Sequence (5' to 3')	PCR Product Length
<i>OxyR</i> Gene	F	AGATGAGCTGGGCGTGATG	572bp
	R	CCATGTTGCGCAGAGTTTCC	
<i>RpoS</i> Gene	F	ATGATCGAGAGTAACCTGGCGT	251bp
	R	ACGTTACAGTCCTTTACGATGT	

۵ min انجام شد و پس از آن مرحله تکثیر DNA با ۳۰ چرخه (°C ۹۵ به مدت ۱۵ S، °C ۵۷/۶ به مدت ۱۰ S و °C ۷۲ به مدت ۱۵ S) و چرخه نهایی تکثیر °C ۷۲ به مدت ۲ min انجام گرفت (۳۱-۳۳).

نتایج

شناسایی جدایه‌ها بر اساس آزمون‌های

بیوشیمیایی

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است سویه‌های باکتریایی گرم منفی و گرم مثبت از نمونه‌ها به تفکیک جداسازی و شناسایی گردید. شایع‌ترین جنس‌های شناسایی شده و درصد فراوانی آن‌ها بر اساس نتایج به‌دست آمده با کمک نرم افزار ABIS Encyclopedia بیانگر حضور باکتری گرم منفی *اشرشیا کولی*^۱ با ۲۰ درصد بیشترین میزان و

معرف‌های مخلوط اصلی PCR برای هر دو ژن هدف به شرح زیر بود: ۱۲/۵ μL مخلوط بافر (۲X)، MgCl₂، dNTP و DNA پلیمرز Taq، ۳ μL الگوی DNA به غلظت ۱۷ng، ۷/۵ μL dH₂O و ۱ μL از هر کدام از پرایمرهای فرورارد و ریورس به غلظت ۱۰ Pm. آزمایش در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ μL صورت گرفت. فرآیند DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر، برای ژن *OxyR*، با چرخه پیش دناتوراسیون °C ۹۵ به مدت ۵ min انجام شد و پس از آن مرحله تکثیر DNA با ۳۰ چرخه (°C ۹۵ به مدت ۲۰S، °C ۵۸/۴ به مدت ۱۵s و °C ۷۲ به مدت ۱۵s) و چرخه نهایی تکثیر °C ۷۲ به مدت ۲ min انجام شد؛ برای ژن *RpoS*، با چرخه پیش دناتوراسیون °C ۹۵ به مدت

¹ *Escherichia coli*

همچنین مهم‌ترین جنس‌های شناسایی شده در گروه باکتری‌های گرم مثبت شامل: *استافیلوکوکوس*^۸، *کورینه باکتریوم*^۹، *انتروکوکوس*^{۱۰} و *باسیلوس*^{۱۱} می باشند.

درمیان باکتری‌های گرم مثبت شایع‌ترین ارگانیزم جدا شده *استافیلوکوکوس*^۱ با ۱۶ درصد بوده است. دراین تحقیق سویه‌های شناسایی شده شامل: *اشرشیا*، *کلبسیلا*^۲، *شیگلا*^۳، *کلورا*^۴، *پروتئوس*^۵، *انتروباکتر*^۶، *پزودوموناس*^۷ می باشند

جدول ۳. شایع‌ترین جنس‌های شناسایی شده، تعداد و فراوانی آنها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی انجام گرفته

کد	جنس و گونه	تعداد (از ۲۵ نمونه)	فراوانی (درصد)
SS-6, E-6, EN6, E-5, SN6	<i>اشرشیا کولی</i>	۵	۲۰
B-8	<i>کلبسیلا</i>	۱	۴
SK11, M-7	<i>شیگلا</i>	۲	۸
SS-5	<i>کلورا</i>	۱	۴
SSN10, BMPS1	<i>پروتئوس</i>	۲	۸
BN5, B-3	<i>انتروکوکوس</i>	۲	۸
MN3, S-5	<i>پزودوموناس</i>	۲	۸
E-8, SS-8	<i>انتروباکتر</i>	۲	۸
E-3, M-5, M-6, MN11	<i>استافیلوکوکوس</i>	۴	۱۶
BN1, BN8, SSN3	<i>کورینه باکتریوم</i>	۳	۱۲
MN13	<i>باسیلوس</i>	۱	۴

SN6- محتویات داخل شکم مرغ سبز تازه روی محیط اسکیرو، E-5- تراشه بافتی مرغ سبز منجمد روی محیط EMB، EN6- محتویات داخل شکم مرغ سبز تازه- محیط EMB، E-6- محتویات داخل شکم مرغ سبز تازه روی محیط EMB، SS-6- محتویات داخل شکم مرغ سبز تازه روی محیط SS agar، B-8- تراشه بافتی مرغ سبز تازه محیط Blood، M-7- آب شستشوی مرغ سبز تازه روی محیط مانیتول سالت آگار، SK11- محتویات داخل شکم مرغ منجمد روی محیط اسکیرو، SS-5- تراشه بافتی مرغ سبز منجمد روی محیط SS agar، SSN10- آب شستشوی مرغ منجمد روی محیط SS agar، BMPS1- آب شستشوی مرغ تازه روی محیط Blood، BN5- تراشه بافتی مرغ سبز منجمد روی محیط Blood، B3- محتویات داخل شکم مرغ تازه روی محیط Blood، MN3- محتویات داخل شکم مرغ تازه روی محیط مانیتول سالت آگار، E-8- تراشه بافتی مرغ سبز تازه روی محیط EMB، SS-8- تراشه بافتی مرغ سبز تازه روی محیط SS agar، E3- محتویات داخل شکم مرغ تازه روی محیط EMB، M5- تراشه بافتی مرغ سبز منجمد روی محیط مانیتول سالت آگار، M6- محتویات داخل شکم مرغ سبز تازه روی محیط مانیتول سالت آگار، MN11- محتویات داخل شکم مرغ سبز منجمد روی محیط مانیتول سالت آگار، BN1- آب داخل بسته بندی مرغ تازه روی محیط Blood، BN8- تراشه بافتی مرغ سبز تازه روی محیط Blood، SSN3- محتویات داخل شکم مرغ تازه روی محیط SSagar، MN13- محتویات داخل شکم مرغ سبز منجمد روی محیط مانیتول سالت آگار.

استافیلوکوکوس، *انتروکوکوس*^{۱۳} می باشند که جدول شماره ۴، درصد شباهت هر یک از جدایه‌ها همراه با توالی شناسایی آنها را نشان می‌دهد. نتایج هم‌چنین بیانگر آن است که جدایه‌های شماره ۷ و ۱۰ قابلیت شناسایی توسط نرم افزار را نداشته است. جدایه‌های غیرقابل کشت شامل: *پزودوموناس*،

شناسایی جدایه‌ها به کمک آزمون‌های مولکولی

نتایج به‌دست آمده از استخراج DNA در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به داده‌های به‌دست آمده از سایت NCBI باکتری‌های قابل کشت شامل: *اشرشیا کولی*، *انتروباکتر*، *شیگلا*، *کلبسیلا*، *پروتئوس*، *آئروموناس*^{۱۲}،

⁸ *Staphylococcus*

⁹ *Corynebacterium*

¹⁰ *Enterococcus*

¹¹ *Bacillus*

¹² *Aeromonas*

¹³ *Enterococcus*

¹ *Staphylococcus*

² *Klebsiella*

³ *Shigella*

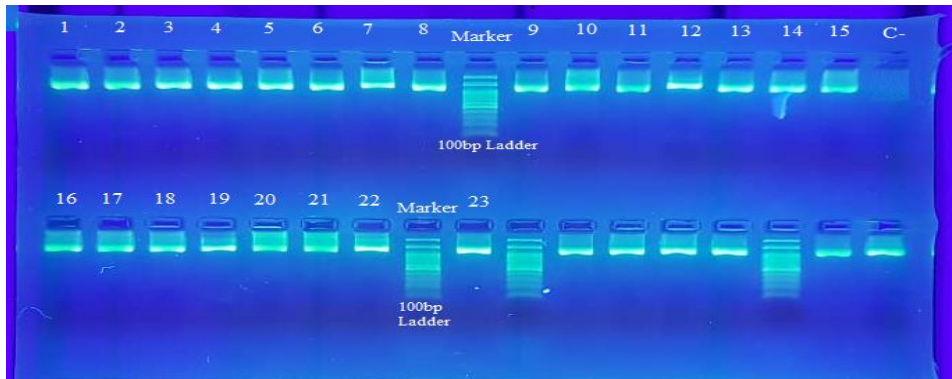
⁴ *Cholerae*

⁵ *Proteus*

⁶ *Enterobacte*

⁷ *Pseudomonas*

سایکروباکتر^۱ و اسیتوباکتر^۲ است که با توجه به شکل ۲ و ۳ به ترتیب شماره ۲۱-۲۲-۲۳ می‌باشند.



شکل ۱. ژل الکتروفورز استخراج DNA جدایه‌ها M: مارکرهای ۱۰۰ جفت بازی در وسط و کلیه جدایه‌های شماره گذاری شده از چاهک

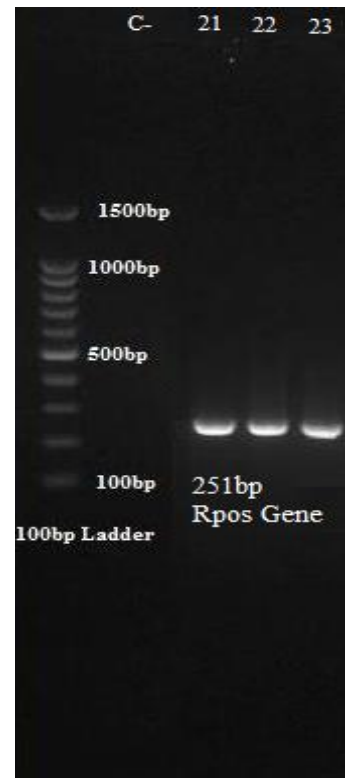
- ۲۳-۱، به ترتیب ۱- اشرشیا ۲- انتروباکتر ۳- اشرشیا کولی ۴- انتروباکتر ۵- شیگلا بویدی ۶- آئروموناس هیدروفیلا ۷-
 -- ۸- اشرشیا کولی ۹- کلبسیلا ۱۰- -- ۱۱- انتروکوکوس فیکالیس ۱۲- اشرشیا کولی ۱۳- اشرشیا کولی
 ۱۴- پروتئوس میرابیلیس ۱۵- شیگلا فلکسنری ۱۶- پروتئوس میرابیلیس ۱۷- انتروباکتر تاباسی ۱۸- استافیلوکوکوس ۱۹-
 unculture bacterium ۲۰- unculture bacterium ۲۱- اسیتوباکتر ۲۲- پرودوموناس ۲۳- سایکروباکتر آلیمنتاروس

² Acinetobacter

¹ Psychrobacter



شکل ۳. ژل الکتروفورز ژن *OxyR*



شکل ۲. ژل الکتروفورز ژن *Rpos*

۲۱- گونه اسیتوباکتر ۲۲- گونه پرودوموناس ۲۳- سایکروباکتر آلیمنتاروس

جدول ۴. ارگانسیم‌های شناسایی شده توسط آزمون مولکولی و درصد تشابه

شماره جدایه	نام باکتری	sequence ID	درصد همولوژی
۱	<i>Escherichia sp.</i> NSESC01	KT361199.1	98درصد
۲	<i>Enterobacter sp.</i> strain Md1-52	MF581458.1	99درصد
۳	<i>Escherichia coli</i> O103 str. RM10042	CP028122.1	98درصد
۴	<i>Enterobacter sp.</i> NK	KT215619.1	98درصد
۵	<i>Shigella boydii</i> strain NCTC 9733	CP026845.1	98درصد
۶	<i>Aeromonas hydrophila</i> strain AH10	CP011100.1	94درصد
۷	-		
۸	<i>Escherichia coli</i> strain ST540	CP007391.1	98درصد
۹	<i>Klebsiella sp.</i> KW10	HQ231951.1	99درصد
۱۰	-		
۱۱	<i>Enterococcus faecalis</i> strain CD1	GQ483456.1	94درصد
۱۲	<i>Escherichia coli</i> strain 2014C-3307	CP027368.1	93درصد
۱۳	<i>Escherichia coli</i> strain NADC 5570/86-24/6564	CP017251.1	97درصد
۱۴	<i>Proteus mirabilis</i> strain WWi82	MH396765.1	90درصد
۱۵	<i>Shigella flexneri</i> 4c strain 0702	CP020339.1	88درصد
۱۶	<i>Proteus mirabilis</i> strain BC11-24	CP026571.1	96درصد
۱۷	<i>Enterobacter tabaci</i> strain Y2	MF678856.1	95درصد
۱۸	<i>Staphylococcus sp.</i> Ap-6	DQ644498.1	95درصد
۱۹	Uncultured bacterium clone DY A25	EU982436.1	95درصد
۲۰	Uncultured organism clone ELU0075-T355-S-NIPCRAMgANa_000196	HQ774449.1	97درصد
۲۱	<i>Acinetobacter sp.</i> strain AL365	MG819294.1	86درصد
۲۲	<i>Pseudomonas sp.</i> B2085	JX266364.1	86درصد
۲۳	<i>Psychrobacter alimentarius</i> strain HB15	KC881247.1	91درصد

بحث

در تحقیق حاضر، طی مطالعه انجام شده در بازه زمانی ۶ ماهه بر روی ۱۰۰ نمونه مرغ تازه و منجمد، تراشه‌های بافتی، محتویات شکمی، آب درون بسته‌بندی‌ها و آب شستشو، ۲۵ سویه با مورفولوژی متفاوت شناسایی گردید. سویه‌ها به ترتیب: ۱۵ جدایه باکتریایی گرم منفی و ۱۰ جدایه گرم مثبت بودند که از بین جدایه‌های مذکور بیشترین فراوانی مربوط به باکتری گرم منفی *اشریشیا کلی* با ۲۰ درصد و از بین جدایه‌های گرم مثبت *استافیلوکوکوس آرنوس* با ۱۶ درصد بود. هم‌چنین جدایه‌ها مورد آنالیز مولکولی قرار گرفتند و از بین ۲۵ جدایه تنها ۳ جدایه حاوی ژن‌های *RpoS* و دو جدایه *OxyR* مورد تایید قرار گرفت. براساس تحقیقات انجام شده توسط جلالی و عابدی (۲۰۰۸) در شهر اصفهان جمعاً ۱۱۷ نمونه از مواد غذایی مختلف را از نظر لیستریا مونوسیژنر^۱ مورد آزمایش قرار دادند و گزارش آن‌ها حاکی از آلودگی ۷/۶ درصد از نمونه‌های گوشت و فرآورده‌های گوشتی است (۲۵). هم‌چنین پس از آن کیورلجوسیک و همکاران^۲ نیز در پژوهش خود در یک دوره شش ماهه از ژانویه تا ژوئن ۲۰۱۷، از مجموع ۱۵ نمونه مرغ جمع‌آوری شده، سه نمونه لیستریا مونوسیژنر را جداسازی کردند. آنها برای تایید لیستریا مونوسیژنر در نمونه‌ها از آزمایشات بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی و هم‌چنین تکنیک PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی استفاده نمودند (۷). این در حالی است که در مطالعه لانتی و همکاران^۳ (۲۰۲۰)، که با هدف اندازه‌گیری شیوع و منشاء بیماری لیستریوزیس در سطوح مختلف خط تولید طیور از ۱۵۶۰ نمونه مدفوع گرفته شده در مراحل مختلف زنجیره فرآوری، یعنی از سواب‌های کلواکال در سطح مزرعه و پس از آن، هیچ نتیجه مثبتی (CI 0-، ۰/۰۲۴) ثبت نشد (۱۰).

براساس آنالیز انجام شده در تحقیق حاضر نیز هیچ یک از جدایه‌ها متعلق به جنس لیستریا نبوده که این امر می‌تواند به دلیل تعداد نمونه‌ها و یا نوع نمونه و نحوه‌ی نمونه‌گیری باشد.

از طرف دیگر هانی و یهیا^۴ (۲۰۱۳)، ۱۰ گونه انتروباکتریاسه از لوله‌گوارش مرغ جداسازی کردند. که شامل ۳۵ جدایه *اشریشیا کلی* (۵۸/۳۳ درصد) با بیشترین فراوانی، ۶ جدایه *سالمونلا آریزونا* (۱۰ درصد)، ۶ جدایه *انتروباکتر کلواسه* (۱۰ درصد)، ۴ جدایه گونه‌های *کلوروا* (۶/۶۶ درصد)، ۲ جدایه *کلبسیلا نومونیا* (۳/۳۳ درصد)، ۲ جدایه *انتروباکتر آئروژینوزا* (۳/۳۳ درصد) و ۱ جدایه *کلبسیلا اکسی کوتا*، ۱ جدایه *سدسه لاپاجیی*^۷، ۱ جدایه *لکترسیا آدکربوکسیلات*^۸ (۱/۶۶ درصد) با کمترین فراوانی در لوله‌گوارش مرغ‌ها بود (۲۶). هم‌چنین حیاتی و همکاران^۹ (۲۰۱۹) در پژوهش خود، ۱۱ جدایه *کلبسیلا نومونیا*^{۱۰} را از سواب‌های کلواک مرغ در مزارع مرغ در جاوه شرقی جدا کردند که تمام آن‌ها باکتری‌های مقاوم به چند دارو^{۱۱} بودند (۲۷). این در حالیست که بیشترین جدایه‌ی شناسایی شده در تحقیق حاضر نیز با فراوانی ۲۰ درصد مربوط به *اشریشیا کلی* بوده و ۴ درصد مربوط به *کلبسیلا* بوده است. حضور *اشریشیا* در تحقیقات مختلف و هم‌چنین تحقیق حاضر بیانگر کنترل ضعیف بهداشتی در مناطق مورد مطالعه می‌باشد. با نگاهی به پژوهش حاضر چنین نتیجه می‌شود که در روش کشت و تشخیص بیوشیمیایی، نمونه‌های تهیه شده به روش سواب و خراشیدن بافت جهت شناسایی و جداسازی باکتری‌ها بهتر از آب شستشوی مرغ‌ها^{۱۲} می‌باشد.

بخش بعدی تحقیق به شناسایی ارگانسیم‌های قابل کشت و غیر قابل کشت از نمونه‌های مرغ به کمک تکنیک مولکولی پرداخته شده است.

⁷ *Cedecia lapagei*

⁸ *Lelercia adecarboxylate*

⁹ Hayati et al., 2019

¹⁰ *Klebsiella pneumoniae*

¹¹ multi drug resistant

¹² Rinsing

¹ *Listeria monocytogenes*

² Kureljušić et al., 2017

³ Lannetti et al., 2020

⁴ Hani and Yehia., 2013

⁵ *Enterobacter cloacae*

⁶ *Kluyvera*

کلی را کاهش داده و حالت VBNC را القا می کند، فعالیت متابولیکی کاهش یافته و پایداری در برابر ۹ آنتی بیوتیک معمول افزایش می یابد. علاوه بر این، آنها بر اساس نتایج RT-PCR نشان دادند تعدادی از ژن ها به ویژه ژن های مقاومت به استرس (*RpoS*)، در مقایسه با سلول های قابل کشت بیشتر بیان شده اند. غلظت درون سلولی را مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که در سلول های VBNC کمتر از اشریشیا کلی در حال رشد فعال است، که نشان دهنده نرخ خروج بالاتر است (۳۲).

در این پژوهش، با مقایسه روش های تشخیص باکتری ها بر اساس کشت و تست های بیوشیمیایی و روش شناسایی مولکولی می توان نتیجه گرفت از ۲۳ نمونه مورد آزمایش ۱۶ جدایه با هر دو روش نتیجه یکسان نشان داده اند. بیشترین آلودگی توسط باکتری های گرم منفی ایجاد شده است و این باکتری ها از طریق مدفوعی دهانی انتقال می یابند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که یا محتویات روده به خوبی تخلیه نشده اند یا سیستم های شستشو به خوبی عمل نمی کنند و بایستی مسیر شستشو و یا کانال های برش و بسته بندی مورد ارزیابی قرار گیرند. بنابراین می توان به مدت زمان حمل هر کدام از مرغ های کشتارگاه ها و به محل توزیع اشاره نمود که چند ساعت به طول می انجامد و به دنبال آن سبدهای انتقال، فاکتور مهم دیگری است که بیانگر آلودگی مرغ ها در کشتارگاه و نوع بسته بندی آنها است. علاوه بر این با توجه به این که سیستم ذبح، شستشو و بسته بندی هر کارخانه تا حدودی متفاوت می باشد می تواند در آلودگی نقش موثری داشته باشد و نتایج بیانگر آن است که مرغ های تازه آلودگی بیشتری نسبت به مرغ های منجمد نشان دادند.

از آنجایی که حالت باکتری ها در ارزیابی سلامت غذایی و در نتیجه سلامت عمومی حائز اهمیت است و

می توان به پژوهش های انجام گرفته در کشور ایران به یافته های دستمالچی و همکاران و نیز ممتاز و همکاران^۱ پرداخت (۲۸، ۲۹) که سائز مارکرها به ترتیب ۶۸۰، ۷۸۰ و ۷۳۰ جفت بازی را برای شناسایی استافیلوکوکوس اورئوس مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مولکولی حاصل از تحقیق موجود حاکی از این است که از ۲۵ نمونه مورد آزمایش PCR، ۳ جدایه باکتری های گرم مثبت شامل استافیلوکوکوس اورئوس (۴/۳۴ درصد) و اتروکوکوس (۴/۳۴ درصد) و سایکروباکتر بوده است. سایر جدایه های مورد شناسایی متعلق به باکتری های گرم منفی و جنس های اشریشیا کولی (۲۱/۷ درصد)، اتروباکتر (۱۳/۰۲ درصد)، شیگلا (۸/۶۹ درصد)، کلبسیلا (۴/۳۴ درصد)، پروتئوس (۸/۶۹ درصد) و یک جدایه گرم منفی آئرو موناس (۴/۳۴ درصد) می باشد. فکرودین و همکاران^۲ (۲۰۱۳)، VBNC را به عنوان مخزن مهمی برای بسیاری از عوامل بیماری زای انسانی در محیط زیست در نظر گرفته و تعدادی باکتری های بیماری زا که می توانند وارد حالت VBNC شوند از جمله آئروموناس هیدروفیلا، آگروباکتریوم تومفاسینس، کمپیلوباکتر ژرونی، اتروباکتر آئروژنز، اتروباکتر کلواکه، اتروکوکوس فکالینس، اشریشیا کلی، هلیکوباکتر پیلوری، کلبسیلا پنومونیه، لژیونلا پنوموفیلا، لیستریا مونوسیتوژنز، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پزودوموناس آئروژینوزا، سالمونلا تیفی، سالمونلا تیفی موربوم، شیگلا، استرپتوکوک فکالینس، ویبریو کلرا و... معرفی کردند (۳۰). از طرف دیگر ایزد پناه در پژوهش خود ایزوله های استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از پرایمر SrRNA^۳ در ۲۳ شهرستان رشت مورد ارزیابی قرار داد و تمامی ایزوله ها باندهای تقریباً ۱۲۵۰ جفت بازی را بر روی ژل آگارز از خود نشان دادند (۳۱). لین و همکاران^۳ (۲۰۱۷)، فرایند کلرزی را در ایجاد حالت VBNC / اشریشیا کلی و پایداری آنتی بیوتیکی باکتری های VBNC بررسی کردند. آنها دریافتند ضد عفونی با دوز پایین کلر (۰/۵mg/l) به طور موثری کشت پذیری اشریشیا

³ Lin et al., 2017

¹ Momtaz et al., 2011

² Fakruddin et al., 2013

سرعت ورود باکتری‌ها به حالت VBNC بیان کردند. نتایج نشان داد که سویه *Yrt2a* باکتری کروموباکتر ساکازاکی ۲۴ روز پس از قرار گرفتن در معرض ۲ ساعت تیمار خشکی، وارد VBNC شد. آنها بیان کردند ژن‌های *Rpos*، *Hfq* و *OmpA* در شرایط استرس افزایش یافت و کروموباکتر با موفقیت استرس را مدیریت کرده، قابلیت کشت‌پذیری و بیماری‌زایی خود را حفظ کرد (۳۴). ما در پژوهش موجود باکتری فوق را مشاهده نکردیم.

شله‌رن^۳ (۲۰۲۰) منشأ *Rpos* را در کلادهای خاص *اشریشیا کولی* بررسی کرد. او در مطالعه خود جهت شناسایی ویژگی‌های رگولون *Rpos* نقش‌های بالقوه تخصصی‌تری برای آن، رونویسی و پروتئومیک را در کلادهای خاص *اشریشیا کولی* ارزیابی نمود. شله‌رن بیان نمود در *اشریشیا کولی*، فاکتور سیگما جایگزین *Rpos* با کنترل بیان بسیاری از ژن‌هایی که سلول را از استرس محافظت و به سلول در جمع‌آوری مواد مغذی کمک می‌کنند، نقش محوری در سازگاری با بسیاری از شرایط رشد غیربینه ایفا می‌کند. *Rpos* بسیاری از سیستم‌های ژنتیکی، از جمله سیستم‌های مؤثر بر بیماری‌زایی، صفات فنوتیپی از جمله مسیرهای متابولیکی و تشکیل بیوفیلم و بیان ژن‌های مورد نیاز برای زنده ماندن از محرومیت از مواد مغذی را کنترل می‌کند (۳۵). در پژوهش حاضر با توجه به ژن *Rpos*، *اشریشیا کولی* شناسایی نشد که می‌تواند به دلیل عدم ایجاد استرس محیطی و عدم بیان آن باشد.

هان و همکاران^۴ (۲۰۰۲)، بیان داشتند که ژنهای *ahpCD* و *OxyR* قابل جداسازی از استرپتومایسز کوالیکولور^۵ بودند و *OxyR* به عنوان تنظیم‌کننده مثبت این ژن‌ها پیشنهاد شد. در استرپتومایسز کوالیکولور، ژن *OxyR* به طور متقاطع از اپرون *ahpCD* رونویسی شده همان‌طوری که در گونه‌های استرپتومایسز ویریدوسپوروس^۶ و گونه‌های میکوباکتریا مورد

باکتری‌های متعددی در شرایط استرس قادر به ورود به این مرحله می‌باشند روش‌هایی جهت شناسایی این نوع باکتری‌ها وجود دارد و تحقیقات متعددی در این زمینه انجام گرفته است.

باتستی و همکاران^۱ (۲۰۱۵) دریافتند *RpoS* توسط باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد تا به شرایط مختلف گرسنگی و استرس پاسخ دهد که به طور کلی "واکنش شدید" نامیده می‌شود. در این شرایط، سطح *RpoS* افزایش می‌یابد، که منعکس‌کننده تثبیت پروتئین و افزایش ترجمه می‌باشد. به علت طیف وسیعی از توابع وابسته به *RpoS*، یک استرس‌القاء *RpoS* می‌تواند مقاومت متقابل را فراهم کند. همان‌طور که سلول‌ها وارد فاز ثابت می‌شوند، برخی عوامل دیگر مانند گرسنگی، انباشت مواد سمی و تغییرات دیگر منجر به افزایش سطح *RpoS* می‌شود (۳۳). از طرف دیگر باتستی و همکاران اعلام نمودند که *اشریشیا کولی* با استفاده از فاکتور سیگما *RpoS*، در شرایط استرس یا گرسنگی برای تغییر برنامه رونویسی از یکی از عواملی که باعث زنده ماندن می‌شود، استفاده می‌کند. پژوهشگران دریافتند که یک وقفه در متابولیسم مرکزی، از طریق حذف ژن کدگذاری پیرووات دهیدروژناز، منجر به افزایش قابل توجه *RpoS* در سلول‌های فاز نمایشی می‌شود. این نشانه متابولیکی احتمالاً از طریق کاهش مقدار استیل کوآنزیم آ است. افزایش *RpoS* به‌وسیله تثبیت پروتئین *RpoS* و با تنظیم مقادیر بالا از سنتز *RpoS* و ارتباط این پاسخ استرس به حالت متابولیسم مرکزی است (۱۵). جمیله و همکاران^۲ (۲۰۱۸)، بیان ژن‌های *RpoS*، *OmpA* و *Hfq* سویه *Yrt2a* از باکتری کروموباکتر ساکازاکی در طول تنش و حالت زنده اما غیرقابل کشت شیر خشک گروه‌های خاصی از نوزادان از نظر منرژیت و انتروکولیت نکروزان مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها مشاهده کردند در روزهای ۴ و ۱۰ انکوباسیون ژن *RpoS* بیان بالاتری نشان داد. که علت آن را مقابله باکتری با استرس و تنظیم

⁴ Hahn et al., 2002

⁵ *Streptomyces coelicolor*

⁶ *S. viridosporus*

¹ Battesti et al., 2015

² Jameelah et al., 2018

³ Schellhorn et al., ۲۰۲۰

پاراهمولیتیکوس جدا شده از ماهی را مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند مهار رشد این جهش یافته *OxyR* توسط پراکسیدهای بیرونی، قندهای اتوکلاو شده و فسفات‌ها توسط ژن مکمل *OxyR* یا با افزودن کاتالاز به محیط اتوکلاو شده از بین رفت، در حالی که هنگام استفاده از قندهای استریل شده با فیلتر، هیچ مهاری از رشد مشاهده نشد. تشکیل بیوفیلم و تحرک شنا در جهش یافته *OxyR* نسبت به سویه وحشی به طور قابل توجهی مهار شد. این تحقیق عملکرد آنتی‌اکسیدانی *OxyR* را در ویبریو همولیتیکوس و نقش‌های احتمالی آن در تشکیل بیوفیلم، تحرک سلولی و محافظت از رشد در محیط غنی از حرارت را نشان داد (۳۸).

پس از آن چن و همکاران^۴ (۲۰۱۸)، برای درک استراتژی ویبریو ولنیفیکوس برای مقابله با استرس اکسیداتیو، ویژگی‌های ساختاری و مکانیسم *OxyR* را در سطح مولکولی تجزیه و تحلیل کردند. آن‌ها بیان داشتند ویبریو ولنیفیکوس دارای دو *OxyR*، *OxyR1* و *OxyR2* است. *OxyR2* نسبت به *OxyR1* سطوح نسبتاً پایین تری از H_2O_2 را تشخیص می‌دهد. نتایج نشان داد که *OxyR2* بیان *prx2* (که پروتئین آنتی‌اکسیدان *Prx2* را کدگذاری می‌کند)، را از طریق یک سوئیچ ردوکس سه حالتی به شدت تنظیم می‌کند و در نتیجه از تولید بیهوده *prx2* در سلول‌ها هنگام قرار گرفتن در معرض سطوح بالای H_2O_2 که برای غیرفعال کردن *Prx2* کافی است، جلوگیری می‌کند. علاوه بر این، آن‌ها با تعیین ساختار کریستالی *OxyR2* مشخص کردند جایگزینی *Gly* حفظ شده در سایر *OxyR*‌ها با *Glu204* در *OxyR2* ویبریو ولنیفیکوس باعث تغییر شکل پیوند پپتیدی قبل از باقیمانده *Glu204* می‌شود که در نتیجه منجر به شکل گیری سفت و سخت زنجیره جانبی *His 205* می‌شود. این ویژگی ساختاری منجر به حساسیت بالای H_2O_2 پروتئین که اساس عملکرد تنظیم کننده‌ها است، می‌شود (۳۹). این در حالی است که هیچ گونه‌ای از ویبریو بر اساس ژن *OxyR* در پژوهش حاضر شناسایی نگردید.

بررسی قرار گرفتند *OxyR*، در اشریشیاکلی بیان خود را به عنوان تنظیم کننده منفی به طور خودکار انجام می‌دهد و بیان *OxyR* در مقایسه با افزایش 10 min اول تیمار شدن با H_2O_2 کاهش می‌یابد. در مقابل استرپتومایسز کوالیکولور، هر دو ژن *ahpCD* و *oxyR* بوسیله H_2O_2 وابسته به *OxyR* القا می‌شوند (۳۶، ۳۷).

از طرف دیگر نقش *OxyR* تنظیم کننده رونویسی H_2O_2 در بافت در پاسخ های استرس اکسیداتیو در استرپتومایسز اورمیتیس^۱ توسط لیو و همکاران^۲ (۲۰۱۶) مورد بررسی قرار گرفت. تحقیقات آن‌ها نشان داد وجود یک جهش حذفی *OxyR* نسبت به سوش WT در مقابل H_2O_2 و هیدروپراکسید ترتیبوتیل حساس تر می‌باشد. این امر نشان می‌دهد که *OxyR* واسطه سیستم ایمنی در برابر H_2O_2 و پراکسید آلی است. شواهد حاکی از این است که در سلول‌های تیمار شده با H_2O_2 خارجی، شکل اکسید شده *OxyR* بیان *ahpCD* را با اتصال به توالی پالندرومی منطقه پروموتور فعال می‌کند. هم چنین *OxyR* اکسید شده بیان سایر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (*KatA1*، *KatA2*، *KatA3* و *OhrB1*) و تنظیم کننده‌های اکسیداتیواسترس (*CatR*، *OhrR* و *OR*) را القا می‌کند. علاوه بر این *sigR* ژن تنظیم کننده استرس تیواکسیداتیو توسط *OxyR* در سطح رونویسی است و نتیجه می‌گیریم که جهت رونویسی *sigR* از پروموتور وابسته به sR برای بیان یک فرم هم شکل بزرگتر ناپایدار sR در طول استرس اکسیداتیو، *OxyR* لازم است تا فعال شود. در پاسخ به استرس اکسیداتیو، *OxyR* تولید سریع آنزیم‌های تخریب کننده H_2O_2 جهت برطرف کردن آسیب‌های اکسیداتیوی از طریق تنظیم مستقیم و آبخار *CatR*، *OhrR* و *OR* تسهیل می‌کند (۱۵).

چونگ و همکاران^۳ (۲۰۱۶)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، رشد، تشکیل بیوفیلم و تحرک سلولی یک جهش یافته حذفی *OxyR* و سویه مکمل ژنتیکی آن در ویبریو

³ Chung et al., 2016

⁴Chen et al., 2018

¹*Streptomyces avermitilis*

² Liu et al., 2016

می‌کنند. در این تحقیق از ۲۳ نمونه تست مولکولی PCR، ۳ ایزوله *پرودموناس*، *اسیتوباکتر* و *سایکروباکتر*، براساس آشکارسازی ژن *Rpos*، با باندهای به وزن ۲۵۱bp بر روی ژل آگارز تشخیص داده شدند. همچنین ۲ ایزوله *پرودموناس* و *سایکروباکتر* براساس آشکار سازی ژن *OxyR*، با باندهایی به وزن ۵۷۲bp بر روی ژل آگارز تایید شدند. بنابراین از آنجایی که صنعت غذا یکی از صنایع مهم در رابطه با سلامت جامعه می‌باشد پیشنهاد می‌شود که در آینده ارزیابی آلودگی میکروبی آب مورد استفاده در کارخانه‌ها و کشتارگاه‌های مرغ، با توجه به ردیابی ژنتیکی سویه‌های غیرقابل کشت کمک شایانی به شناسایی باکتری‌های موجود در مواد غذایی و یا مطالعه استرس باکتریایی با استفاده از مارکرهای ژنتیکی گردد.

نتیجه گیری کلی

از آنجاکه انسان‌ها همواره به دنبال راه‌هایی جهت افزایش کیفیت ایمنی غذاها و سلامتی جامعه هستند و در مقابل میکروارگانیسم‌ها نیز در حال تغییرات ژنتیکی و یافتن راه‌هایی جهت سازگاری با محیط زیست خود می‌باشند که از آن جمله می‌توان ورود به فاز غیرفعال و یا افزایش مقاومت چند دارویی را نام برد، یکی از راه‌های ارتقای سلامت افراد جامعه، شناسایی باکتری‌ها از طریق روش‌هایی با درصد اطمینان بالاتر مانند تکنیک‌های مولکولی است که مکمل تست‌های سنتی و تشخیصی بیوشیمیایی است. هم‌چنین نیاز ضروری و مبرم جهت ارزیابی دائمی و تصادفی از مواد غذایی در سطوح مختلف تولید، انتقال و عرضه به مشتری توسط نمایندگان وزارت بهداشت وجود دارد. هم‌چنین با توجه به جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌هایی مهم در این تحقیق به نظر می‌رسد که استفاده از فن‌آوری‌های روز دنیا در سیستم‌های مکانیزه تخلیه شکم، سردکن‌ها، سیستم‌های بسته بندی و وسایل حمل مواد غذایی، جهت افزایش کیفیت ارگانولیتیکی مواد غذایی و افزایش مدت ماندگاری غذا را

ال وی و همکاران^۱ (۲۰۲۰)، نشان دادند که PMA-qPCR با استفاده از پروپیدیوم مونوزاید روش سریع، خاص و حساس برای تشخیص و تعیین کمیت کمپیلوباکتر ژرونی در محصولات طیور است و ژن *RpoB* را هدف قرار می‌دهد (۱۲).

تحقیقات در این زمینه ادامه یافت تا چودهاری و همکارانش^۲ (۲۰۲۴)، با بهره‌گیری از پیشرفت‌های تصویربرداری تک سلولی جهت دنبال کردن رفتار سلولی در یک محیط کنترل‌شده مداوم برای مدت طولانی بر پاسخ استرس اکسیداتیو/شریشیایی کلی به پراکسید هیدروژن تمرکز کردند. آنها آزمایش‌ها را برای بیان تنظیم رونویسی ۳۱ ژن تنظیم‌شده توسط *OxyR* که به عنوان بخشی از پاسخ استرس اکسیداتیو شناسایی شده‌اند، ترکیب و دینامیک بیان ژن را با استفاده از میکروسکوپ مرور زمان از سلول‌های *شریشیا* کلی تصویربرداری کردند. تجزیه و تحلیل آن‌ها بر روی "سلول‌های مرزی" متمرکز شد. مطالعه آنها نشان داد سلول‌های واقع در زیر سلول‌های مرزی، به دلیل جذب و جمع‌آوری کارآمد H₂O₂، غلظت‌های کاهشی H₂O₂ را تجربه کرده و در نتیجه پاسخ استرس کمتری نشان دهند. بخش دیگری از تحقیقات آنها، مطالعه‌ی سویه‌ی AB1157 از *شریشیا* کلی حامل جهش کهریایی در *Rpos* بود. این امر به آنها امکان داد نقش *OxyR* را در تنظیم ژن بدون تأثیر تنظیم فاز ثابت برخی از ژن‌های پاسخ به استرس اکسیداتیو توسط *Rpos*، جدا کنند. مدل‌سازی و آزمایش‌ها نشان می‌داد که دینامیک اتصال *OxyR* همراه با اثرات استرس بر سرعت رشد سلول می‌تواند الگوهای مختلف تنظیم ژن را توضیح دهد (۴۰).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد برخی باکتری‌ها مانند *اسیتوباکتر* و *سایکروباکتر* که در محیط‌های کشت قادر به رشد نبوده‌اند و قابل شناسایی نیستند را می‌توان از تکنیک شناسایی مولکولی و با بررسی ژن‌های اختصاصی شناسایی نمود. این باکتری‌ها عوامل بیماری‌زای پنهان هستند که در شرایط استرس قابلیت بقا و بیماری‌زایی خود را حفظ

² Choudhary et al., 2024

¹ Lv et al., 2019

می‌طلبند، به انضمام آن‌که فناوری‌های نوین و سیستم‌های
مرتبط با صنعت غذا نیز مورد آنالیز قرار گیرند.

منابع

۱. Cox J, Pavic A. Advances in enteropathogen control in poultry production. *Journal of Applied Microbiology*. 2010;108(3):745-55.
۲. Paghuhi Alamoti M, Mohammadzadeh, A., Khanjari, A. Investigation of microbial contamination of broiler carcasses during the slaughter line of Hamedan Industrial Slaughterhouse. *Veterinary Journal*, No 103,. 2014.
۳. Escudero-Gilete M, González-Miret M, Temprano RM, Heredia F. Application of a multivariate concentric method system for the location of *Listeria monocytogenes* in a poultry slaughterhouse. *Food Control*. 2007;18(1):69-75.
۴. Gill C, Badoni M. Recovery of bacteria from poultry carcasses by rinsing, swabbing or excision of skin. *Food Microbiology*. 2005;22(1):101-7.
۵. Cruz-Romero M, Murphy T, Morris M, Cummins E, Kerry J. Antimicrobial activity of chitosan, organic acids and nano-sized solubilisates for potential use in smart antimicrobially-active packaging for potential food applications. *Food Control*. 2013;34(2):393-7.
۶. Cruz-Romero M, Kerry JP. Packaging systems and materials used for meat products with particular emphasis on the use of oxygen scavenging systems. *Emerging technologies in meat processing: production, processing and technology*. 2017:231-63.
۷. Kureljušić J, Rokvić N, Jezdimirović N, Kureljušić B, Pisinov B, Karabasil N, editors. Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* in poultry meat by standard culture methods and PCR. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*; 2017: IOP Publishing.
۸. Parra A, Toro M, Jacob R, Navarrete P, Troncoso M, Figueroa G, et al. Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. *Brazilian journal of microbiology*. 2018;49(suppl 1):113-8.
۹. Cao X, Wang Y, Wang Y, Ye C. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the black-headed gull feces in Kunming, China. *Journal of Infection and Public Health*. 2018;11(1):59-63.
۱۰. Iannetti L, Schirone M, Neri D, Visciano P, Acciari VA, Centorotola G, et al. *Listeria monocytogenes* in poultry: Detection and strain characterization along an integrated production chain in Italy. *Food microbiology*. 2020;91:103533.
۱۱. Oliver JD. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. *Nonculturable microorganisms in the environment*. 2000:277-300.
۱۲. Lv R, Wang K, Feng J, Heeney DD, Liu D, Lu X. Detection and quantification of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Frontiers in microbiology*. 2020;10:2920.
۱۳. Reichelt B, Szott V, Stingl K, Roesler U, Friese A. Detection of viable but non-culturable (VBNC)-*Campylobacter* in the environment of broiler farms: innovative insights delivered by propidium monoazide (PMA)-v-qPCR analysis. *Microorganisms*. 2023;11(10):2492.
۱۴. Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:258.
۱۵. Liu X, Sun M, Cheng Y, Yang R, Wen Y, Chen Z, et al. OxyR is a key regulator in response to oxidative stress in *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology*. 2016;162(4):707-716.
۱۶. Capita R, Alonso-Calleja C, Prieto M. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103(5):1366-75.
۱۷. Rouger A, Remenant B, Prévost H, Zagorec M. A method to isolate bacterial communities and characterize ecosystems from food products: validation and utilization in as a reproducible chicken meat model. *International Journal of Food Microbiology*. 2017;247:38-47.
۱۸. Soltan Dalal MV, S. Zeraati ,H. Bakhtiari, R. Khalifah Gholi, M. Izadpour, F. Rouhani Rankouhi, Z. Nowruz Babaei, H. Kafashi, T. Fazeli, S. P. Kamkar, A. Comparison of the prevalence of microbial contamination of packaged and non-packaged red meat and

- poultry in retailers and chain stores in southern Tehran. Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd 2007;Volume 15, Issue 1, Spring 2007, Pages 35-43.
۱۹. Guyard-Nicodème M, Tresse O, Houard E, Jugiau F, Courtillon C, El Manaa K, et al. Characterization of *Campylobacter* spp. transferred from naturally contaminated chicken legs to cooked chicken slices via a cutting board. International journal of food microbiology. 2013;164(1):7-14.
۲۰. Mosa MI, Salem HM, Bastamy MA, Amer MM. The potential diversity of intestinal Enterobacteriaceae in broiler chickens is associated with infectious bursal disease virus infection. Egyptian Journal of Veterinary Sciences. 2024;55(4):917-30.
۲۱. Goh SG, Leili A-H, Kuan CH, Loo YY, Lye YL, San Chang W, et al. Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. Food Control. 2014;37:51-5.
۲۲. Amanloo S, Rashki, Z. Coagulase Performance standard for the determination of antimicrobial susceptibility by the disk diffusion method, . Microbiology Laboratory Workbook Jame'e-Negar Publications. 2012.:pp. 89-97.
۲۳. al. JKe. Practical Guide to Bacteriology Laboratory. . Payam Sobhan Publications Coagulase Catalase Oxidase. 2012. .
۲۴. Barghouthi SA. A universal method for the identification of bacteria based on general PCR primers. Indian journal of microbiology. 2011;51:430-44.
۲۵. Jalali M, Abedi D. Prevalence of *Listeria* species in food products in Isfahan, Iran. International journal of food microbiology. 2008;122.۴-۳۳۶:(۳)
۲۶. Yehia HM, Riyadh K, Arabia S. Antimicrobial resistance patterns of Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae isolated from poultry intestinal. Life Sci J. 2013;10(1):3438-46.
۲۷. Hayati M, Indrawati A, Mayasari NLPI, Istiyaningsih I, Atikah N. Molecular detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates of chicken origin from East Java, Indonesia. Veterinary world. 2019;12(4):578.
۲۸. Saei HD, Ahmadi M, Mardani K, Batavani R. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis based on polymorphism of the coagulase gene in the north west of Iran. Veterinary microbiology. 2009;137(1-2):202-6.
۲۹. Momtaz H, Tajbakhsh E, Rahimi E, Momeni M. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical and sub-clinical bovine mastitis in Isfahan and Chaharmahal va Bakhtiari provinces of Iran. Comparative clinical pathology. 2011;20:519-22.
۳۰. Fakruddin M, Mannan KSB, Andrews S. Viable but nonculturable bacteria: food safety and public health perspective. International Scholarly Research Notices. 2013;2013(1):703813.
۳۱. Izad Panah R. Study of Coa gene diversity in *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples in Rasht. . Thesis for obtaining a master's degree Field: Cellular and Molecular Biology, Major: Microbiology. 2015.
۳۲. Lin H, Ye C, Chen S, Zhang S, Yu X. Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. Environmental Pollution. 2017;230:242-9.
۳۳. Battesti A, Majdalani N, Gottesman S. Stress sigma factor RpoS degradation and translation are sensitive to the state of central metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(16):5159-64.
۳۴. Jameelah M, Dewanti-Hariyadi R, Nurjanah S. Expression of rpo S, omp A and hfq genes of *Cronobacter sakazakii* strain Yrt2a during stress and viable but nonculturable state. Food science and biotechnology. 2018;27(3):915-20.
۳۵. Schellhorn HE. Function, evolution, and composition of the RpoS regulon in *Escherichia coli*. Frontiers in microbiology. 2020;11:560099.
۳۶. Hahn J-S, Oh S-Y, Roe J-H. Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Journal of bacteriology. 2002;18.۲۲-۵۲۱۴:(۱۹)۴
۳۷. Hahn J-S, Oh S-Y, Roe J-H. Role of OxyR as a Peroxide-Sensing.

۳۸. Chung C-H, Fen S-y, Yu S-C, Wong H-c. Influence of oxyR on growth, biofilm formation, and mobility of *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and environmental microbiology*. 20۰۹;۷۸(۳):۸۲-۸۶.
۳۹. Chen S, Li X, Wang Y, Zeng J, Ye C, Li X, et al. Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state through chlorination/chloramination and differences in characteristics of the bacterium between states. *Water Research*. 2018;142:279-88.
۴۰. Choudhary D, Foster KR, Uphoff S. The master regulator OxyR orchestrates bacterial oxidative stress response genes in space and time. *Cell systems*. 2024;15(11):1033-45. e6.