احیاء باکتری اشرشیا کولی تغییر یافته به حالت زنده اما غیر قابل رشد با بکارگیری شوک‌های محیطی

محمد هیئت[۱]، رضا عباسی لرکی[۲]*، حسین آقاملایی[۱]، مهرداد موسی زاده مقدم[۳]، عاطفه یاعلی جهرمی[۴]

۱.دانش آموخته کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران
۲.دانش آموخته کارشناس ارشد میکروبیولوژی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن
۳.دانش آموخته کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، تهران
۴.دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی جهرم

* **نشانی برای مکاتبه:** مازندران ، تنکابن- ولی آباد، مجتمع آموزشی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن – صندوق پستی: ۴۶۸۱۵۵۸۶،
Reza_abbasi.biology@yahoo.com ، تلفن: ۰۱۹۲-۴۸۲۹۰۱۶

دریافت مقاله: آبان نود پذیرش برای چاپ: دی نود

چکیده

سابقه و هدف: *عدم رشد باکتری بر روی محیط کشت همیشه دلیلی بر عدم وجود باکتری یا مرگ آن نیست. گروهی از باکتری‌ها می‌توانند وارد حالتی شوند که در عین زنده بودن، توان مندی خود را برای رشد بر روی محیط‌های کشت معمولی از دست می‌دهند. این حالت از بقاء باکتری را زنده اما غیرقابل رشد Viable But Non-Culturable می‌نامند که تنها تست‌های مبتنی بر زنده بودن باکتری‌ها، حیات آن‌ها را تأیید می‌نماید. این حالت خود می‌تواند عاملی جدی برای بروز برخی از بیماری‌های عفونی ناشی از مصرف موادی باشد که سلامت میکروبی آن‌ها تأیید شده‌است. مطالعه حاضر با بکارگیری برخی استرس‌های محیطی، توان مندی Non-Culturable E. coli برای برون‌رفت از این فاز و احیاء مجدد را مورد بررسی قرار می‌دهد.*

روش کار: *باکتری‌های Non-Culturable E. coli پس از جمع‌آوری، جهت انجام فرآیندهای متفاوت به گروه‌های مختلف تقسیم شدند و در معرض شوک حرارتی ۴۲ درجه در مدت زمان‌های مختلف، غلظت‌های متفاوت نمک‌های صفراوی و نمک طعام و ترکیب این روش‌ها قرار گرفتند.*

یافته‌ها: *نمک‌های صفراوی ۱۵ میلی‌مولار، NaCl ۴۵ میلی‌مولار و شوک ۲ دقیقه‌ای ۴۲ درجه سانتی‌گراد هرکدام به ترتیب تعداد ۱×۱۰^{۴} و $۰/۶\times۱۰^{۴}$ و $۳/۱\times۱۰^{۴}$ CFU/ml را بر روی محیط کشت نشان دادند. ترکیب این پارامترها به صورت دو به دو نتایج مطلوبی به همراه داشت. اعمال همزمان سه استرس با ارتقاء OD رشد تا ۰/۵۸ و تعداد ۹×۱۰^{۸}CFU/ml بهترین پاسخ را ارائه داد.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌ها بیان می‌دارند که با القای برخی تغییرات محیطی در کشت باکتری می‌توان مسیر رشد باکتری‌هایی که به حالت سکون رشدی درآمده اند را به حالت طبیعی بازگرداند.*

واژگان کلیدی: ***Non-Culturable Bacteria E. coli ، نمک‌های صفراوی، نمک طعام، شوک حرارتی***

مقدمه

سال‌های متمادی میکروبیولوژیست‌ها بر این باور بودند که رشد باکتری‌ها تنها شاخص حیات آن‌ها است، اما این اعتقاد نمی‌توانست تمامی پدیده‌ها اکولوژیکی را تفسیر نماید. تعدادی از باکتری‌ها زنده گرم مثبت و گرم منفی در برخی شرایط ویژه قابلیت رشد و تقسیم سلولی خود را از دست می‌دهند. این روی داد در قالب تعریف سنتی حیات قابل توجیه نیست. برخی از باکتری‌های فاقد اسپور ممکن است وارد فازی بشوند که در آن حالت، زنده می‌مانند اما توانایی رشد و تقسیم شدن خود را در محیط های مرسوم از دست می‌دهند، این حالت با عنوان "زنده ولی غیر قابل رشد " معادل عبارت لاتین Viable But Non-Culturable Bacteria (VBNC) نام گذاری گردید(۱). این باکتری‌ها فعالیت متابولیکی و تنفس خود را در سطحی بسیار پایین نگه می‌دارند(۲). اکولوژیست‌هایی که بر روی جمعیت باکتریایی، مطالعه می‌کردند تفاوت قابل ملاحظه ای را بین تعداد کل باکتری‌ها (مجموع باکتری‌های زنده و مرده) و تعداد کلنی‌های ناشی از باکتری‌های زنده مشاهده کردند. این محققین نشان دادند که تعدادی از باکتری‌ها زنده هستند اما توانایی رشد خود را از دست داده‌اند، لذا در شمار تعداد کل باکتری‌ها به حساب می‌آیند اما CFU جمعیت باکتریایی را تغییر نمی‌دهند. پژوهش گران دیگری نیز مطرح نمودند که برخی مواقع تنها ۱درصد از باکتری‌هایی که با میکروسکوپ مشاهده می‌شوند قادر به رشد هستند.

آن‌ها این مشاهدات را به مرگ سلولی فصلی تعبیر می‌کردند(۳). برخی از عوامل ایجاد VBNC شامل فقر مواد غذایی، آسیب‌های کشنده سلولی، دماهای پائین، تطابق یا تمایز، مواد غذایی تسریع کننده مرگ و باکتریوفاژهای لایزوژنیک می‌باشند(۳،۴). باکتری‌های VBNC قابلیت زنده ماندن خود را بر اساس کاهش مصرف سوبسترا و فعالیت متابولیکی طراحی می‌کنند. سلول‌های VBNC یک کاهش چشمگیر در اندازه خود را متحمل می‌شوند، به گونه‌ای که به حالت بیضی و تخم مرغی در می‌آیند و تغیرات مهمی در ساختار غشاء، ترکیب پروتئینی و محتوای ریبوزمی خود می‌دهند(۲، ۳). از آن‌جایی که گزارشات نشان می‌دهند بسیاری از باکتری‌های پاتوژن مانند ویبریوکلرا، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس،کمپیلوباکتر ژژونی، هلیکوباکتر پیلوری، ویبریو ولنیفیکوس و اشرشیا کلی می‌توانند وارد فاز VBNC شوند، این حالت از باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند به عنوان یکی از مخاطرات اصلی برای سلامت عمومی جامعه مطرح گردد. در برخی موارد یک باکتری پاتوژن VBNC که از آزمایشات تشخیصی معمولی می‌گریزد پس از ورود به میزبان دوباره به حالت فعال خود باز می‌گردد و ایجاد بیماری می‌نماید(۵،۶).

تاکنون روش‌های متنوعی برای تشخیص باکتری‌های VBNC طراحی شده‌است. از جمله این روش‌ها می‌توان به رنگ آمیزی حیاتی، استفاده از ژن‌های گزارش گر(۷)، اپی فلورسنت مستقیم، RFLP، PCR-DGGE (۸)، RT-PCR (۹)، اشاره نمود. همچنین برای تشخیص حیات باکتری‌ها از مواد نظیر ۵-سیانو-۲،۳-دیتولیل تترازولیوم (CTC) و] ۲-(p یودوفنیل)-۳- (p-نیتروفنیل)-۵ فنیل تترازولیوم کلراید] (INT) یا شمارش مستقیم باکتری‌های زنده (DVC) (۱۰) استفاده می‌نمایند. گاهی VBNC ها به صورت خود به خود دوباره بازیابی شده و به‌حالت طبیعی رشد باز می‌گردند اما گاهی اوقات نیاز به بکارگیری یک سری تغییرات فیزیکی- شیمیایی می‌باشد تا بتوان آن‌ها را دوباره به فاز طبیعی بازگرداند. جزئیات دقیقی در مورد مکانیسم عمل کرد این ترفندها در دسترس نیست. از این قبیل روش‌ها می‌توان به تیمار با بافر فسفات، غنی سازی محیط کشت، مجاور سازی باکتری با اسید هیپوکلروس (HOCl) (۱۰)، قرارگیری باکتری‌ها در محیط نمکی حاوی نمک های آمونیوم در دما و زمان معین(۱۱) تزریق به حیوان آزمایشگاهی(۱) و برخی روش‌های دیگر اشاره نمود(۴). در مطالعه پیش رو قصد بر این است که باکتری‌های نوترکیب E. coli DH5α که به صورت تصادفی طی تحقیقات و در اثر دست ورزی‌های مکرر، برودت طولانی مدت دما و مجاورت با درصد بالای گلیسرول به حالت VBNC درآمده است، پس از انجام تست‌های تایید کننده، با استراتژی بکارگیری شوک‌های محیطی از قبیل شوک حرارتی، شوک‌های نمکی و همچنین غنی سازی محیط کشت به حالت طبیعی بازگرداند.

روش کار

نمک‌های صفراوی، نمک طعام و محیط کشت LB براث و آگار از شرکت مرک، گونه‌های باکتریایی VBNC E. coli DH5α که به صورت تصادفی تحت فشار برودتی (دمای منهای ۸۰ درجه سانتی گراد)، کمبود مواد غذایی و درصد بالای گلیسرول (گلیسرول ۸۰ درصد) ایجاد شده بودند از آزمایشگاه‌های مرکز فناوری‌های زیستی دانشگاه امام حسین(ع) تهیه و گازامینواسید و گلوکز از شرکت سیگما تهیه شد.

پس از انجام تست های اولیه تأیید کننده حالت VBNC مانند: ۱- عدم کشت بر روی محیط کشت غنی شده LB agar (LB agar، گلوکز۰/۲ درصد، کازامینو اسید ۱ درصد) پس از کشت ۴۸ ساعته. ۲- اندازه‌گیری چگالی نوری (Optical Density) با استفاده از نانودراپ، پس از کشت ۴۸ ساعته در محیط کشت غنی شده LB broth (LB broth، گلوکز۰/۲ درصد، کازامینو اسید ۱ درصد). ۳- مشاهده باکتری‌ها در رنگ آمیزی حیاتی (Vital staining) و ۴- مشاهده آنها با بزرگ نمایی ۱۰۰۰X میکروسکوپ نوری باکتری ها برای روند بعدی آماده شدند.

۱۵۰ میکرولیتر از باکتری‌های استوک VBNC به ۱۵میلی‌لیتر از محیط کشت LB broth تلقیح گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. سپس باکتری‌ها به گروه‌های ۱ میلی لیتری برای انجام تست‌های مختلف، مندرج در جدول ۱ تقسیم بندی شدند.

در مدل اولیه استرس ۹ ویال ۲ میلی لیتری با شماره ۱ الی ۸ برچسب گذاری گردید و ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری‌های VBNC E. coli DH5α به هر کدام از ویال‌ها منتقل گردید. نمک های NaCl و نمک های صفراوی (Bile salt) با غلظت ۱ مولار تهیه شد و با استفاده از فیلتر 0.2µm استریل گردید. بر اساس طرح مندرج در جدول ۱ غلظت‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میلی مولاری از نمک NaCl و نمک‌های صفراوی به صورت مستقل به ویال‌های مربوطه اضافه شد و به مدت یک شب تا صبح در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد. نمونه‌های باکتریایی نیز همچنین به صورت مستقل در معرض شوک حرارتی با الگوی جدول ۱ قرار گرفتند. در انتها نتایج برای آنالیزهای بعدی ثبت گردید.

جدول ۱: ساختار مدل اولیه استرس؛ اعمال مستقل استرس‌های نمکی و حرارتی

مدت زمان بازیابی	شرح مدل اعمال استرس	شماره ویال
۱۲ ساعت در محیط کشت غنی شده LB broth	یک میلی‌لیتر باکتری + ۱۵ میلی مولار نمک صفراوی	۱
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۳۰ میلی مولار نمک صفراوی	۲
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۴۵ میلی مولار نمک صفراوی	۳
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۱۵ میلی مولار نمک طعام	۴
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۳۰ میلی مولار نمک طعام	۵
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۴۵ میلی مولار نمک طعام	۶
	شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه برای یک میلی‌لیتر باکتری	۷
	شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱/۵ دقیقه برای یک میلی‌لیتر باکتری	۸
	شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه برای یک میلی‌لیتر باکتری	۹

پس از انجام استرس‌های طرح اول، به منظور تعیین میزان اثرگذاری مستقل هر کدام از شوک‌ها و سنجش قابلیت رشد باکتری‌ها، ۱ میکرولیتر از تمامی نمونه‌های جدول ۱ بر روی محیط کشت غنی شده LB agar کشت داده شد و تعداد باکتری های بازیابی شده به حالت طبیعی بر ای هر کدام از نمونه ها شمارش شدند.

OD باکتری‌ها در محیط کشت مایع با استفاده از دستگاه نانو دراپ اندازه گیری ثبت گردید. بر اساس نتایج بدست آمده از مدل اول، یک مدل ترکیبی نیز طراحی گردید و نمونه‌های دارای بهترین نتایج در طرح اول انتخاب شدند و شرایط دو به دو بر روی نمونه‌ها اعمال گردید. در انتها نیز هر سه شوک محیطی برای گزینه‌های منتخب اعمال گردید. ترکیب استرس‌ها بر اساس مدل مندرج در جدول ۲ انجام و ثبت گردید.

جدول ۲: ساختار مدل ترکیبی اعمال استرس

مدت زمان بازیابی	شرح مدل اعمال استرس	شماره ویال
۱۲ ساعت در محیط کشت غنی شده LB broth	یک میلی‌لیتر باکتری + ۱۵ میلی مولار نمک صفراوی +۴۵ میلی مولار نمک طعام	۱
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۱۵ میلی مولار نمک صفراوی+ شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه	۲
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۴۵ میلی مولار نمک طعام+ شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه	۳
	یک میلی‌لیتر باکتری + ۱۵ میلی مولار نمک صفراوی +۴۵ میلی مولار نمک طعام + شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه	۴

در مرحله بعد همانند روش مذکور در بالا سنجش عمل کرد استرس‌ها انجام شد. بدین ترتیب که پس از رقیق‌سازی باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ در سرم فیزیولوژی، کشت باکتری‌ها بر روی محیط غنی شده LB agar جهت شمارش باکتری‌های قادر به رشد، و اندازه گیری OD باکتری ها در محیط کشت مایع انجام شد و نتایج ثبت گردید.

یافته‌ها

پس از انجام مدل اولیه استرس‌های نمکی و حرارتی، تست‌های محاسبه CFU و سنجش OD محیط کشت مایع جهت بررسی چگونگی عملکرد این استرس‌های محیطی انجام شد. تعداد باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت جامد در نمونه‌های ۱، ۶ و ۹ که به ترتیب با نمک‌های صفراوی ۱۵ میلی مولار، نمک NaCl ۴۵ میلی مولار و شوک حرارتی ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه تیمار شده بودند، از سایر مدل ها بیشتر بودند. در نتیجه این سه مدل بیشترین تأثیرات را بر روی احیاء باکتری‌های VBNC داشته‌اند. از آنجا کدورت ایجاد شده توسط باکتری‌های بازیابی شده از حد آستانه کدورت برای جذب نوری کشت باکتری پائین‌تر بود، دستگاه قادر به تشخیص این میزان تغییرات نمی‌باشد. با استناد به نتایج این مرحله نمونه‌هایی که بیشترین القاء شدگی را از خود نشان دادند برای مدل ترکیبی انتخاب شدند(جدول ۳).

جدول ۳: نتایج حاصل از عملکرد مستقل هر کدام از استرس های نمکی و حرارتی

نمونه‌ها	CFU/ml	OD
۱	۱×۱۰^{۴}	ND (مشاهده نشد)
۲	$۰/۰۱\times۱۰^{۴}$	
۳	ND (مشاهده نشد)	
۴	ND (مشاهده نشد)	
۵	$۰/۱\times۱۰^{۴}$	
۶	$۰/۶\times۱۰^{۴}$	
۷	$۱/۲\times۱۰^{۴}$	
۸	$۲/۳\times۱۰^{۴}$	
۹	$۳/۱\times۱۰^{۴}$	

ترکیب دو به دو استرس‌های نمکی-نمکی و نمکی-حرارتی تا حدودی بر روی افزایش قدرت رشد باکتری‌ها مؤثر واقع شد به گونه‌ای که OD باکتری‌ها در نمونه‌های ۱، ۲، ۳ از جدول ۲ به ترتیب ۰/۰۵ ، ۰/۲۵ و ۰/۱۳ گزارش گردید که در مقایسه با نمونه‌های مدل اولیه که استرس ها به تنهایی اعمال می‌شدند تغییرات کاملا محسوسی مشاهده گردید. کشت نمونه‌های ۱ الی ۳ بر روی محیط کشت غنی شده LB agar پس از رقیق سازی باکتری در سرم فیزیولوژی نیز نشان از افزایش تعداد باکتری‌های بازیابی شده به حالت طبیعی داشتند، به نحوی که نمونه ۱، ۲ و۳ به ترتیب با ۱×۱۰^{۷}، ۳×۱۰^{۸} و $۱/۲\times۱۰^{۸}$ CFU/ml پس از ۱۲ ساعت گرماگذاری بر روی محیط کشت ظاهر شدند. با ثبت OD رشد باکتری به میزان ۰/۵۸ و تعداد باکتری ۹×۱۰^{۸} CFU/ml مطلوب‌ترین نتیجه در حالت اعمال هم زمان استرس‌های محیطی بدست آمد(نمونه ۴ جدول ۲).

بحث

اصطلاح viable but nonculturable bacteria (VBNC) برای سلول های باکتریایی زنده‌ای بکاربرده می‌شود که به صورت طبیعی قادر به رشد نیستند. این باکتری‌ها فعالیت متابولیکی خود را در سطح بسیار پایینی حفظ می‌نمایند اما قابلیت خود را برای رشد و تقسیم از دست می‌دهند. بنابراین روش سنتی شناسایی باکتری‌ها که مبتنی بر کشت باکتری بر روی محیط کشت در آزمایشگاه می‌باشد قادر به شناسایی این گروه از باکتری‌ها نخواهد بود(۱۲). VBNC در حقیقت نوعی مکانیسم دفاعی است. برخی از باکتری‌ها از این مکانیسم برای حفظ بقاء خود در شرایط محیطی نامساعد استفاده می‌نمایند. شرایطی مانند مواجهه با حرارت، خشکی، فشار اسمزی بالا، مواد شیمیایی مهارکننده، فقر غذایی، درصد اکسیژن، افزودنی‌های نگهدارنده مواد غذایی(۱۳) باعث از دست رفتن تعدادی از ریبوزم‌ها، آسیب به آنزیم‌ها و غشاء سلولی، DNA و سایر تغییراتی می‌شوند که فراتر از دانش کنونی ما است. در نتیجه این تغییرات، باکتری برای حفظ بقای خود، فرایند رشد و تقسیم خود را طی مکانیسمی ناشناخته متوقف می‌نماید و توان خود را معطوف فعالیت‌های متابولیکی و تنفسی حداقلی می‌نماید(۴). حالت VBNC تاکنون تنها برای باکتری‌هایی که اسپور تولید نمی‌کنند گزارش شده است.

در سال‌های اخیر حالت VBNC برای گونه‌های ویبریوکلرا، اشرشیا کولیEHEC و O157:H7، کمپیلوباکتر ژژونی، گونه‌های مختلف سالمونلا، لیستریا مونوسایتنس، یرسینیا انتروکولیتیکا، گونه‌های کلبسیلا، انتروباکتر، استافیلوکوکوس اورئوس و چند گونه دیگر گزارش شده است(۱،۱۴). ورود باکتری‌های پاتوژن به فاز VBNC اهمیت مطالعه بر روی این قبیل باکتری‌ها را آشکار می‌نماید. گریز باکتری‌های پاتوژن از سیستم‌های معمولی تشخیصی می‌تواند یه یک معضل بهداشتی تبدیل شود(۱۵). همچنین روش‌های دستگاهی و شیمیایی ایجاد شده برای شناسایی باکتری‌های زنده ولی غیر قابل رشد عموما وابسته به تعداد باکتری هستند. بدان معنا که در مواردی که تعداد باکتری‌های VBNC از یک حد آستانه پائین‌تر باشند توسط این روش‌ها قابل تشخیص نیستند. این موضوع آن هنگامی اهمیت می‌یابد که مشاهده می‌گردد برخی از بیماری‌های پاتوژن با تعداد بسیار کمی باکتری ایجاد بیماری می‌نمایند. بنابراین احیاء باکتری‌ها و بازیابی آن‌ها به حالت طبیعی رشد می‌تواند گام مؤثری برای شناسایی باکتری‌ها باشد. درک صحیحی از اکولوژی باکتری‌های VBNC خطر ایجاد عفونت‌های میکروبی را کاهش می‌دهد. تغییر شرایط به حالت طبیعی، استفاده از برخی شوک‌های محیطی، بکارگیری برخی مواد شیمیایی می‌تواند گروهی از این قبیل باکتری‌ها را به حالت طبیعی بازگرداند. مکانیسم عمل کرد این روش‌های احیاگر نیز به درستی شناخته نشده است. در برخی از سیستم‌های باکتریایی، به کارگیری این روش‌ها منجر به ایجاد چالشی در باکتری می‌گردد. نیازمندی باکتری برای پاسخ به این شوک‌ها می‌تواند خود نقایص به وجود آمده در باکتری را رفع نماید. به عنوان مثال شوک حرارتی باعث تولید کلاس‌هایی از چپرون‌ها باکتریایی می‌گردد یا مثلا نمک‌های صفراوی توسط برخی از باکتری ها حس شده و به عنوان سیگنالی برای تولید و ترشح برخی افکتورهای باکتریایی عمل می‌نماید(۱۶). در گزارشات مختلفی که از مطالعه بر روی VBNCها استخراج شده است روش‌های تجربی برای بازگرداندن و احیاء مجدد ارائه شده است. شلیوا و همکارانش برای بازیابی باکتری‌های VBNC مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سوپرنانتانت باکتری استفاده نمودند(۱۷). این روش هم چنین توسط کاپریلیانتس و همکارانش برای احیاء باکتری میکروکوکوس لوتئوس استفاده گردید(۱۸). استدلال این محققین بر این قاعده استوار است که باکتری‌های دارای قابلیت رشد ماده‌ای را تولید نموده و در محیط منتشر می‌نماید که این ماده برای رشد باکتری‌ها ضروری است. Sam و همکارانش برای احیای باکتری‌های اشرشیا کولی که تحت تاثیر HOCl به حالت VBNC تبدیل شده بودند از تیمار آن‌ها در بافر فسفات استفاده نمودند(۱۰). استفاده از سوپرناتانت باکتری‌های اشرشیا کولی رشد کرده و هم چنین تیمار باکتری هایVBNC با بافر فسفات در مطالعه پیش رو نیز مورد آزمایش قرار گرفت که نتایج مطلوب و محسوسی حاصل نشد (روش کار و نتایج گزارش نشده است). آقای وای و همکارانش در مطالعه‌ای که از لحاظ بکارگیری شوک حرارتی تا حدودی مشابه تحقیق حاضر بود موفق شدند باکتری‌های ویبریوکلرا که پس از کشت ۱۰۰ روزه در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد در محیط M9 حاوی نمک‌های آمونیوم وارد فاز VBNC شده بودند را با اعمال شوک حرارتی ۱ دقیقه‌ای در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به حالت فعال و طبیعی بازیابی نمایند(۱۱). اعمال شوک حرارتی البته با الگویی متفاوت، برای مطالعه ما نیز کارگر واقع شد. به نحوی که هم به صورت مستقل و هم در حالت هم‌افزایی با سایر تغییرات محیطی اثر قابل ملاحظه‌ای بر روی احیاء باکتری برجای گذاشت. اولیور و همکارانش با تزریق باکتری VBNC ویبریوکلرا ولنیفیکوس به موش توانستند این باکتری را به حالت فعال بازگردانند(۱۹). جداسازی و تخلیص باکتری اشرشیا کولی از حیوان آزمایشگاهی به نحوی که مطمئن باشیم این باکتری همان باکتری تزریق شده است نیاز به بکارگیری روش‌های پیشرفته دارد که امکان انجام آن مهیا نبود و در تحقیق ما این روش برای احیاء باکتری مورد آزمایش قرار نگرفت. محققان مختلفی از شیوه غنی سازی محیط کشت برای احیای این باکتری ها استفاده نموده اند. در تحقیق پیش رو نیز از کازامینو اسید ۰/۱ و گلوکز برای غنی سازی محیط کشت استفاده گردید که به تنهایی اثری در جهت احیاء باکتری نداشتند.

نمک طعام و نمک‌های صفراوی هر کدام با بکار انداختن مکانیسم‌های ویژه خود تحریکاتی را به باکتری وارد می‌نمایند و باکتری را وادار به به‌جریان انداختن سیستم بیان ژن، و مسیرهای متابولیکی می‌نماید این خود می‌تواند مسیرهای وابسته بسیاری را به راه اندازد و جریان فعالی را در راستای بازگشت به حالت طبیعی ایجاد نماید. به عنوان مثال در باکتری شیگلا نمک‌های صفراوی به عنوان عاملی که قابلیت تهاجمی شیگلا را القاء می‌کنند لازم است. روش‌های آزمایشگاهی _محاسباتی نشان می‌دهند که دزوکسی‌کولات به عنوان یک نمک صفراوی به صورت مستقیم به پروتئین IpaD درنوک دستگاه ترشحی شیگلا متصل می‌شوند و سیگنال‌هایی که در اثر این تماس به داخل باکتری ارسال می‌شوند، باعث بیان شدن دو دسته بسیار بزرگ از ژن‌های مهاجم می‌گردد. از اصلی‌ترین لوازم تهاجم باکتری شیگلا، تکثیر و رشد آن می‌باشد که در کنترل همین کلاس‌های ژنی است. بنابراین مشخص می‌گردد که این دسته از مواد خود می‌توانند محرکی برای راه اندازی سیستم‌های حیاتی باکتری می‌باشند(۱۶).

نتیجه‌گیری

یافته‌ها بیان می‌دارند که با القای برخی تغییرات محیطی در کشت باکتری می‌توان مسیر رشد باکتری‌هایی که به حالت سکون رشدی درآمده اند را به حالت طبیعی بازگرداند.

تشکر و قدردانی

از تمامی افرادی که برای به انجام رساندن این تحقیق ما را یاری نمودند بویژه جناب آقای مهندس بابک براتی، پژوهشگر و مربی گروه زیست شناسی دانشگاه امام حسین (ع)، تشکر و تقدیر می‌نماییم.

REFERENCES

1.Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria, Journal of microbiology Seoul Korea, 2005; 43: 93-100.

2.Colwell R. In Non-culturable Microorganisms in the Environment, ASM, Washington DC, USA, 2000; 325–342.

3.Oliver JD. The viable but non-culturable state in the human pathogen Vibrio vulnificus. FEMS Microbiol. Lett., 1995; 133: 203–208.

4.Douglas BK, Arseny SK, Dieter HW, Colin RH, Michael RB. Viability and activity in readily culturable Shleeva bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie van Leeuwenhoek, 1998; 73: 169–187.

5.MO, Bagramyan K. Formation and resuscitation of "non-culturable" cells of Rhodococcus rhodochrous and Mycobacterium tuberculosis in prolonged stationary phase. Microbiology, 2002; 148: 1581–1591.

6.Rivers B, Steck TR. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. Urol. Res, 2001; 29: 60–66.

7.Power DA, Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR, Dawes PJ. Non-Culture-Based Analysis of Bacterial Populations from Patients with Chronic Rhinosinusitis. journal of clinical microbiology, 2005; 5822–5824.

8.Divol B, Lonvaud AF. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis-affected wine, J. Appl. Microbiol, 2005; 99: 85–93.

9.Pai SR, Actor JK, Sepulveda E, Hunter RL, Jagannath C. Identification of viable and non-viable Mycobacterium tuberculosis in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA. Microbial Pathology, 2000; 28: 335-342.

10. Sam D, Yves L, Danie`le T. Recovery of Culturability of an HOCl-Stressed Population of Escherichia coli after Incubation in Phosphate Buffer: Resuscitation or Regrowth? applied and environmental microbiology. 1997; 4204–4209.

11.Wai SN, Moriya T, Kondo K, Misumi H, Amako K. Resuscitation of Vibrio cholerae O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock. FEMS Microbiol. Lett. 1996; 136: 187–191.

12.Sun Z, Chen X, Bai X. Viable but nonculturable state of bacteria and its hygiene significance, Journal of hygiene research, 2009; 38: 251-254.

13.Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiology Reviews, 2009; 415-425.

14.Năşcuţiu AM. Viable non-culturable bacteria. Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol. 2010; 55: 8-11.

15.Dinu LD, Bach S. Induction of viable but non-culturable Escherichia coli O157:H7 on the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor. Appl. Environ. Microbiol. 2011. under publication.

16.Stensrud KF, Adam PR, Lamar CD, Olive AR, Lushington GH, Sudharsan R, Shelton NL, Givens RS, Picking WL, Picking WD. Deoxycholate Interacts with IpaD of Shigella flexneri inInducing the

Recruitment of IpaB to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip. Biological Chemistry. 2008; 27: 18646-18654.

17.Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov MV, Mukamolova GV, Young M, Kell DB, Kaprelyants AS. Formation and resuscitation of 'nonculturable' cells of Rhodococcus rhodochrous and Mycobacterium tuberculosis in prolonged stationary phase, Microbiology. 2002; 148: 1581–1591.

18.Kaprelyants AS, Mukamolova GV, Kell DB. Estimation of dormant Micrococcus luteus cells by penicillin lysis and by resuscitation in cellfree spent medium at high dilution. FEMS Microbiol. Lett. 1994; 115: 347–352.

19.Oliver JD, Bockian R. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of Vibrio vulnificus. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61: 2620–2623.