بررسی و جداسازی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E از ماهیان دودی و تازه کپور معمولی، سفید و فیتوفاگ

رضا صفری و عیسی خندقی

موسسه تحقیقات شیلات ایران
بخش تکنولوژی فرآورده‌های شیلاتی، مرکز تحقیقات شیلاتی استان مازندران، ساری - صندوق پستی ۹۶۱
تاریخ دریافت : خرداد ۱۳۷۷ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۷۷

چکیده

به منظور مطالعه و تعیین درصد آلودگی ماهیان دودی و تازه استان مازندران به کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E تعداد ۱۸۰ نمونه ماهی دودی وتازه شامل ماهی کپور معمولی دودی (۳۰ نمونه)، ماهی سفید دودی (۳۰ نمونه) فیتوفاگ دودی (۳۰ نمونه) از سه کارگاه ماهی دودی واقع در منطقه غرب وکپور معمولی تازه (۳۰نمونه)، سفیدتازه (۳۰ نمونه) و فیتوفاگ تازه (۳۰ نمونه) از منطقه تازه آباد و کارگاه شهید رجایی ساری استان مازندران بصورت تصادفی تهیه گردیدند. نمونه‌ها براساس نوع و کیفیت تقسیم‌بندی شدند. نتایج مطالعات باکتری شناسی و تعیین توکسین باکتری بااستفاده از روش تزریق عصاره سانتریفوژ شده به موش ایمن (تزریق شده با آنتی توکسین منووالان تیپ E باکتری) و غیرایمن نشان داد که تعداد ۱۳ نمونه (۷/۲ درصد) شامل ۷ نمونه (۳/۸ درصد) ماهی کپور دودی وتازه، ۲ نمونه (۱/۱ درصد) ماهی سفید دودی و تازه و ۴ نمونه (۲/۲ درصد) ماهی فیتوفاگ دودی و تازه به کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E آلوده بودند که سهم ماهیان دودی ۱۰ نمونه وماهیان تازه ۳ نمونه بود.

مقدمه

با توجه به افزایش صید و تولید ماهیان و راندازی و توسعه کارخانجات فرآوری آبزیان احتمال انتقال بیماریهای مشترک ناشی از مصرف آبزیان رو به افزایش است (سلطانی ، ۱۳۷۴ ؛

سلطانی ۱۳۷۶). در این میان عوامل باکتریایی بیماریزای ماهیان و قابل انتقال به انسان نقش قابل توجهی دارند که از آن جمله می‌توان به مسمومیت‌های ناشی از کلستریدیوم‌ها بویژه کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E اشاره نمود (آخوندزاده بستمی، ۱۳۷۳ ؛ مدرس ، ۱۳۶۸ و ۱۳۷۴ ؛ سلطانی ، ۱۳۷۶).

در ایران اولین همه‌گیری بوتولیسم در خرداد ماه ۱۳۴۴ همزمان با همه‌گیری بیماری فاویسم در گیلان بوسیله Lipeyssonni در ۲۹ بیمار بستری شده در بیمارستان پورسینای رشت گزارش شد. این همه‌گیری بدنبال مصرف تخم ماهی کپور شور ایجاد و بدنبال بررسی نمونه‌های باقیمانده در انستیتو پاستور ایران وجود هاگ وسم کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E تشخیص داده شد. بدنبال این همه‌گیری در تابستان ۱۳۵۱ نیز چندین همه‌گیری در گیلان رخ داد که ۲۵۶ مورد بوتولیسم گزارش شده که تا پایان سال ۱۳۵۴ به ۳۸۹ مورد رسید ولی تابحال گزارشی ازبوتولیسم بدنبال مصرف ماهی خام ارائه نشده است. تحقیقات وسیعی که برروی تیپهای مختلف کلستریدیوم بوتولینوم در فرآورده‌های غذایی و دریایی انجام پذیرفت، نشان داد که تیپهای مختلف این باکتری توانایی آلوده کردن مواد غذایی را داشته و از بین این تیپها، تیپ E بیشترین درصد آلودگی را به خود اختصاص داده و در حدود ۱۰ درصد ماهیان تازه از گونه‌های مختلف به این تیپ آلوده بودند (مدرس ۱۳۶۸، ۱۳۷۴، ۱۳۷۵ ؛ روح بخش، ۱۳۶۹). با توجه به وجود کارگاههای ماهی دودی در استانهای شمالی و مصرف بالای ماهی توسط مردم و با توجه به سوابق همه‌گیری‌های بالا، ضرورت مطالعه باکتری شناسی برای تعیین میزان آلودگی این کارگاهها امری بدیهی است لذا در این مطالعه تلاش شده تا با نمونه‌برداری از کارگاهها، نسبت به تعیین و تأئید کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E اقدام شود.

مواد و روشها

تعداد ۱۸۰ نمونه ماهی از سه گونه کپور معمولی، ماهی سفید و فیتوفاگ بصورت دودی و تازه از نظر آلودگی به کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه ماهی دودی از سه کارگاه ماهی دودی استان مازندران (تنکابن، بابل و فریدونکنار) جمع‌آوری و در مجاورت یخ به

آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلاتی استان منتقل و تا زمان آزمایش در دمای ۱۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نمونه ماهی تازه از صید پره استان واقع در تازه آباد (کپور و سفید) و کارگاه شهید رجایی ساری (فیتوفاگ) جمع‌آوری و در مجاورت آب دریا به آزمایشگاه مرکز منتقل و مورد آزمایش قرار گرفتند.

از دو روش مستقیم و غیرمستقیم Dehof , 1994 و مدرس ، ۱۳۷۴ جهت تعیین توکسین این باکتری استفاده گردید. در روش مستقیم، ابتدا به مقدار ۴ تا ۱۰ گرم از عضله ماهی میزان مساوی بافرفسفات ژلاتین اضافه نموده، به مدت ۱۰ دقیقه بخوبی مخلوط (pH - ۶/۶) کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس مایع رویی را بااستفاده از فیلترهای میلی پور (۰/۴۵ میکرون) و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر تریپسین به ازاء ۱ میلی‌لیتر مایع صاف شده اضافه گردید. محول حاصل را در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت نگهداری و سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از مایع حاصل، را به هر یک از موشهای ایمن (قبلاً بوسیله آنتی توکسین متووالان تیپ E ایمن شده بودند) و موش غیرایمن بصورت داخل صفاقی تزریق گردید. با مرگ موش غیرایمن و عدم مرگ موش ایمن وجود و یا عدم وجود توکسین تیپ E تائید می‌شد.

در روش غیرمستقیم به مقدار ۴ تا ۱۰ گرم از عضله ماهی، میزان یکسان بافرفسفات اضافه و بمدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. سپس مقدار ۳ تا ۵ گرم از نمونه فوق در لوله‌های حاوی محیط گوشت پخته (Cooked meat broth) به مدت ۱۵ دقیقه با در شل در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حرارت داده شدند. محیطهای فوق را ابتدا در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه نگهداری، سپس به مدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد و در شرایط بی‌هوازی نگهداری شدند. پس از آن مایع رویی را جدا نموده، سانتریفوژ کرده وبه ازاء ۱ میلی‌لیتر از مایع رویی مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر تریپسین اضافه و در دمای ۳۷ درجه بمدت یک ساعت نگهداری گردید. از مایع مذکور میزان ۰/۵ میلی‌لیتر به موش ایمن و غیرایمن طبق روش فوق تزریق گردید.

جهت کشت و جداسازی کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E، میزان ۴ تا ۱۰ گرم عضله ماهی را توزین و به مقدار مساوی با فرفسفات ژلاتین اضافه و بمدت ۱۰ دقیقه مخلوط نموده و مقدار ۳ تا ۵ گرم آنرا به لوله‌های حاوی محیط کشت گوشت پخته اضافه و در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد

بمدت ۱۵ دقیقه نگهداری و سپس محیطها را ابتدا به بن ماری با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد بمدت ۱۵ دقیقه منتقل و بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی مطلق نگهداری شدند. میزان ۰/۵ میلی‌لیتر از محیط کشت به محیط آگار حاوی زرده تخم‌مرغ منتقل و میزان ۱ میلی‌لیتر الکل ۷۰ درصد بر روی سطح محیط بمدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق اضافه و بعد از آن بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد در شرایط بی‌هوازی قرار داده شد. از نمونه‌های رشد یافته ابتدا گسترش تهیه شد و سپس رنگ‌آمیزی گرم، رنگ امیزی اسپور، آزمایشات کاتالاز، لیپاز، لسیتیناز، ژلاتین، تخمیر قند مانوز، SIM و شیر تورنسل دار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یکساعت بعمل آمد.

قابل ذکر است که از کولونیهای مشکوک در محیط آگار حاوی زرده تخم‌مرغ، ابتدا برای رنگ آمیزی گرم و اسپور و سپس جهت انجام تستهای اولیه مانند کاتالاز و اکسیداز و در نهایت تستهای دیگر استفاده گردید (Macfaddin , 1980). این باکتری دارای اسپور نزدیک به انتها، کاتالاز و اکسیداز منفی می‌باشد.

با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه و لزوم توجه به بهداشت عمومی، ضرورت تجدید نظر در اصول نگهداری و روشهای عمل‌آوری ماهیان اینگونه کارگاهها امری لازم بنظر می‌رسد.

نتایج

نتایج باکتری شناسی در این مطالعه در جدول ۱ آمده است. براساس نتایج جدول ۲ ماهی کپور دودی و ماهی سفید تازه به ترتیب بیشترین (۵۳/۸ درصد) و کمترین (صفر) الودگی را داشته در حالیکه ماهی فیتوفاگ تازه و دودی به میزان ۳۰/۷ درصد آلوده بودند.

جدول ۱ : نتایج آزمایشهای بیوشیمیایی انجام شده برای نمونه های ماهی مورد آزمایش

مانوز	حرکت	رشد در شیر تورنسل‌دار	لیپاز	لسیتیناز	H2S	اندول	رشد در آبگوشت پخته	ژلاتین
+	+	-	+	هاله باریک	-	-	-	+

جدول ۲ : توزیع فراوانی و فراوانی نسبی ۱۳ مورد آلودگی، برحسب نوع و جنس فرآورده، به کلستریدیوم بوتولینوم تیپ E

کیفیت ماهی / گونه ماهی	تازه		دودی		مجموع	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
کپور	۲	۲۸/۵	۵	۷۱/۴	۷	۵۳/۸
سفید	۰	۰	۲	۱۰۰	۲	۱۵/۵
فیتوفاگ	۱	۲۵	۳	۷۵	۴	۳۰/۷
مجموع	۳	۲۳/۱	۱۰	۷۶/۹	۱۳	۱۰۰

بحث

همه‌گیریهای ناشی از مصرف ماده غذایی آلوده به توکسین یا اسپورکلستریدیوم بوتولینوم تیپ E بیشتر به دلیل مصرف غذاهای فرآیند شده است و به بواسطه تغییراتی است که در حین فرآوری حاصل می‌گردد که از این تغییرات می‌توان به پائین آمدن شرایط اکسیداسیون و احیاء اشاره نمود.

بطور کلی برای دودی کردن ماهی از غلظت ۲ تا ۳ درصد نمک استفاده می شود (Light salting) ولی در بعضی از کارگاههای سنتی از آب نمک اشباع برای شورکردن نیز استفاده می‌شود (رضوی شیرازی ، ۱۳۷۳). اسپور باکتری در غلظت نمک ۵ درصد زنده مانده و براحتی توکسین تولید می‌نماید ولی در غلظتهای بالاتر توکسین فعال می‌ماند ولی اسپور مدت زیادی زنده نمانده و غیرفعال می‌گردد و در این مورد باید به آلودگی ثانویه ناشی از نگهداری ماهی توجه کرد. آب نمک ۳ درصد در دمای ۱۰ و ۲۰ درجه بترتیب بمدت ۱ و ۳۰ روز از تولید توکسین جلوگیری می کند (Cann , 1979). همه‌گیریهای مختلفی در رابطه با مصرف ماهی و تخم شور گزارش شده است (مدرس ، ۱۳۷۴ ؛ روح بخش ، ۱۳۶۹). مدرس در طی مطالعه ۱۵ ساله‌ای که بر روی فرآورده‌های غذایی از نظر آلودگی به کلستریدیوم بوتولینوم انجام داد خاطر نشان کرد که بیشترین آلودگی نسبت به این باکتری مربوط به ماهی شور می‌باشد (مدرس ، ۱۳۷۵،۱۳۷۴،۱۳۶۸).

در کارگاههای ماهی دودی از دو روش دودی کردن سرد و گرم برای دود دادن ماهی استفاده

می‌گردد. در دود سرد، ماهی حرارت نمی‌بیند و درجه حرارت در حدود ۳۰ درجه بوده و از ۴۵ درجه تجاوز نمی کند، زمان دود سرد کمتر از ۴ ساعت بوده ولی در بعضی از کارگاهها ماهی رابه مدت ۶ تا ۷ روز در اطاق دود قرار می‌دهند (رضوی شیرازی ، ۱۳۷۳). در این روش چنانچه ماهی آلوده به اسپوریاتوکسین تیپ E باشد هرگز از بین نرفته و احتمال آلودگی و فساد آن توسط باکتریهای دیگر فراهم می‌گردد (Duss *et al.*, 1994 ; Huss & Pedersen , 1993 ; Post *et al.*, 1985). در روش دود گرم از دمای ۸۵ درجه ولی با مدت زمان کوتاهتراستفاده می‌شود و ماهی بطور کامل حرارت می‌بیند و اسپور تیپ E غیرفعال می‌گردد (Dehof , 1994).

در برخی از شهرهای ساحلی استان مازندران برای نگهداری ماهی دودی و شور از خمره‌های حاوی آب نمک با درب مسدود استفاده می‌شود که در نگهداری طولانی مدت و به شرط آلودگی اولیه ماده غذایی به بوتولینوم، زمینه فعالیت اسپور در شرایط بی‌هوازی فراهم گشته و مانع رشد باکتریهای هوازی شده و در صورت مساعد شدن شرایط، تبدیل به سلول رویشی می‌شود و تولید توکسین می‌نماید (میرزمانی و آل‌آقا ، ۱۳۷۵). در این مناطق برحسب عادات محلی مصرف ماهی دودی و شور بالا می‌باشد و بخاطر غیربهداشتی بودن این عمل، مشکلاتی را بدنبال خواهد داشت ولی تاکنون همه‌گیری مهمی در رابطه با مصرف ماهی دودی در استان مازندران رخ نداده ولی در استان گیلان چندین همه‌گیری بدنبال مصرف ماهی دودی و شور اتفاق افتاده است (روح‌بخش ، ۱۳۶۹ ؛ مدرس ، ۱۳۷۴).

در رابطه با آلودگی ماهیان تازه باید خاطر نشان کرد که منشاء اصلی انتشار اسپورهای این باکتری خاک بوده و از این طریق هم به آب انتقال پیدا می‌کند. نتایج آزمایشات Pederson که بر روی سواحل کپنهاک صورت پذیرفت ۸۴ درصد آلودگی به اسپورهای تیپ E کلستریدیوم بوتولینوم را مشخص می‌نماید. گزارشهای مکرر پژوهشگران روسیه نشان می‌دهد که ۱۰ درصد خاکهای مورد آزمایش، آلوده به اسپورهای کلستریدیوم بوتولینوم هستند که تیپ E بیشتر از تیپهای دیگر جدا شده است (Haq & Suhadi , 1986 ; Gerard & Friend , 1995). پس آلودگی اولیه ماهیان پس از صید و جمع‌آوری آنها در سواحل می‌باشد. در روش صید با پره ماهیان صید شده در جعبه‌های چوبی ریخته شده و باندکی شستشو به بازار عرضه می‌گردند که این مسئله می‌تواند بالقوه باعث آلودگی ماهیان صید شده گردد.

با توجه به موارد بالا اگر بعد از خرید ماهی، بهنگام طبخ بحد کافی حرارت داده نشود (آماده کردن ماهی بصورت شکم پر)، احتمال از بین رفتن اسپور باکتری ضعیف بوده و خطراتی را در پی

دارد (مرتضوی، ۱۳۷۱).

در مورد آلودگی ماهیان براساس نوعشان باید ذکر کرد که ماهیهای مختلف برحسب عادات و وضعیت خاص زیستی از یکسو و کیفیت و شکل نگهداری آنها پس از صید و عمل‌آوری از سوی دیگر درجات مختلفی از آلودگی نسبت به تیپ E را نمایان می سازند (Ekland & Poysky, 1988). براساس نتایج بدست آمده ماهی کپور بیشترین آلودگی به این تیپ رانشان داده است و ماهی سفید نسبت به بقیه آلودگی کمتری داشته است ولی با این وجود ارتباط معنی‌داری مابین آلودگی به باکتری و نوع ماهی وجود ندارد ($P>0/05$) و این مسئله احتمالاً بواسطه نوع تغذیه ماهی کپور و تماس دائمی با گل و لای و رسوبات دریا می‌باشد از طرف دیگر گزارشات نشان می‌دهد که تیپ E به کرات از رسوبات دریا نیز جدا شده است (مدرس، ۱۳۷۴؛ میرزمانی و آل‌اقا، ۱۳۷۵).

منابع

آخوندزاده بستمی، الف، ۱۳۷۳. بهداشت مواد غذایی دریایی از دیدگاه میکروبی، مجله علوم و صنایع غذایی، شماره ۵، صفحات ۴۸ تا ۵۲.

رضوی شیرازی، ح. ۱۳۷۳. تکنولوژی فرآورده‌های دریایی. انتشارات شیلانه، صفحات ۲۶۸ تا ۲۷۲.

روح بخش، ع.، ۱۳۶۹. کنترل بهداشتی مواد خوراکی، انتشارات چهره. صفحات ۱۷۰ تا ۱۷۳.

سلطانی، م.، ۱۳۷۴. پاتوژنهای جدید باکتریایی ماهی. مجله سلامت، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور، صفحات ۴۲ تا ۴۴.

سلطانی، م.، ۱۳۷۶. بیماریهای باکتریایی ماهی. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، صفحات ۳۱۹ تا ۳۲۲.

مدرس، ش.، ۱۳۷۴. مسمومیت غذایی باکتریال و اسهال‌های حاد عفونی. انتشارات گلفام، صفحات ۱۵۰ تا ۲۰۶.

مدرس، ش.، ۱۳۶۸. مطالعه اپیدمیولوژیک و تعیین سروتیپهای کلستریدیوم بوتولینوم در ایران. پایان نامه دکترای باکتریولوژی. انتشارات دانشگاه تهران. ۹.

مدرس، ش.، ۱۳۷۵. نقش انواع کلستریدیوم بوتولینوم در آلودگی مواد غذایی در ایران. مجموعه مقالات نهمین کنگره صنایع غذایی، صفحات ۲۹۰ تا ۲۹۸.

مرتضوی، ع.، ۱۳۷۱. اطلس میکروبیولوژی غذایی. انتشارات گلشن، صفحات ۱۱۲ تا ۱۱۵.

میرزمانی، ش.؛ آل آقا، س.، ۱۳۷۵. بیماریهای مشترک قابل انتقال از آبزیان به انسان. ماهنامه آبزیان شماره ۷۲. صفحات ۵۰ تا ۵۲.

Cann, D.C. ; Taylor, L.Y. , 1979. The control of the botulism hazard in hot smoked and mackerel, J. Food Technol. Vol. 14. No. 2. pp.123-129.

Dehof, E. , 1994. Investigation on the stability of hot smoked vaccum packed trout fillets with special regard to *Clostridium botulinum* type E , Rheinische Friedrich Wilhelms Univ. P. 175.

Duss, K.I. ; Brodsky, M.H. ; Warburton, D.W. , 1994. A retail survey of smoked ready-to-eat fish to determine their microbiological contamination, J.Food.Prot. Vol. 55. No.3. pp.208-210.

Ekland, M.W. ; Poysky, F.T. ; Peterson, M.E. ; Peck, L.W. ; Bruson, W.D. , 1988. Type E botulinum in salmonids and conditions contributing to outbreaks. Aquaculture Vol. 4. pp.293-309.

Gerard, J. ; Friend, M. , 1995. Microbiology an Introduction. The Benjamin cummings publishing company. pp.542-544.

Haq, I. ; Suhadi, F. , 1986. Incidence of *Clostridium botulinum* in coastal and Inland areas of West Java. Jap. J. Med. Vol. 4. pp.231-235.

Huss. H.H. ; Pedersen, A. , 1993. *Clostridium botulinum* in fish Nord. Vet. Med. Vol. 5. pp.214-221.

Macfaddin, J.F. , 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Williams and Wilkin. pp.356-358.

Post, H.S. ; Solberg, M. ; Furgang, D. ; Graham, C. ; Lee, D.A. , 1985. Development of botulinal toxin and sensory deterioration during storage of vaccum and modified atmosphere packaged fish fillets, J.Food Sci. Vol.50. No.4. pp.990-998.

Evaluation and Isolation of *Clostridium botulinum* Type E from Fresh and Smoked *Cyprinus carpio*, *Rutilus frisii kutum* and *Hypophtalmicthys molitrix*

Safari R. and Khandagi A.

I.F.R.O.

Fish Products Technology Dep., Mazandaran Fisheries Center,

P.O.Box: 961 Sari, Iran

recived : Jun 1998 accepted :January 1999

ABSTRACT

In this study expriments were conducted to evaluate *Clostridium botulinm* type E in fresh and smoked *Cyprinus carpio* (60 samples) *Rutilus frisii kutum* (60 samples) and *Hypophtamicthys molitrix* (60 samples).

One hundred and eighty samples of fish were collected from different smoking plants, beach sein and breeding center in Mazandaran province, were sorted in order to quality and kind of fish. Two methods (Toxicology and Bacteriology) were used for recongnition of toxin and bacterium *C. botulinum* type E. Bacterium was identified using cooked meat broth, egg yolk agar and biochemical tests. Toxin was recongnized using antitoxin type E.

The results indicated that 7 (3.8%), 4 (2.2%) and 2 (1.1%) samples of fresh and smoked *Cyprinus carpio*, *Rutilus frisii kutum* and *Hypophtalmichthys molitrix* were contaminated to *C. botulinum* type E respectively, (10 samples of smoked fish, 3 samples of fresh fish in total).

In a conclusion, a serious consideration on handling and processing of fish in these plants are recommended.