

پدیداری و پایداری مقاومت فشاربالا در پاتوژن های غذایی مختلف

فرآوری فشار هیدروستاتیک بالا (HHP)¹ یک روش پاستوریزه کردن غذا بدون گرمایش است اگرچه این نگرانی وجود دارد که مقاومت باکتریایی HHP می تواند امنیت و پایداری غذاهای فرآوری شده با HHP را به خطر بی اندازد. در حالی که میزان مقاومت طبیعی HHP در میان و بین گونه های باکتریایی متفاوت است، همچنان یک پرسش بدون پاسخ باقی می ماند که تا چه میزان پاتوژن های غذایی مختلف می توانند در واقع مقاومت HHP را افزایش دهند. در این مطالعه، ما توان ذاتی برای توسعه ی مقاومت HHP را در میان چند باکتری به نام های اسکرکیا کولی، شیگلا فلکسنری، سالمونلا انتریکا سروارس و..... ارزیابی و مقایسه کردیم که این امر از طریق رویکرد غنی سازی انتخابی انجام شد. جالب اینکه، از میان همه ی نژادهای باکتریایی ارزیابی شده، فراگیری مقاومت شدید HHP تنها در برخی نژادهای E.coli قابل یافت است که نشان می دهد یک زمینه ژنتیک خاص ممکن است برای توسعه مقاومت لازم باشد. همچنین، وقتی که فراگیری انجام شد، مقاومت HHP یک خاصیت بسیار پایدار می شود به گونه ای که برای بیش از 80 نسل در غیاب HHP باقی ماند. در نهایت، در سطح مکانیکی، مقاومت HHP الزاما به تنزل ژن های شوک گرمایی ارتباط ندارد و به پدیده ی مقاومت ارتباطی ندارد.

مقدمه

فرآوردی فشار هیدروستاتیک بالا (HHP) اکنون به عنوان یکی از بهترین روش های غیرگرمایی حفظ غذا در نظر گرفته می شود و برای پاستوریزه کردن تعداد زیادی از محصولات غذایی مود استفاده قرار می گیرد. معمولا، فشارها از 200 تا 600 MPa می باشند تا پاتوژن های غذایی و میکروارگانیسم های فاسد کننده را غیرفعال کنند از این رو امنیت و طول عمر محصول بالا می رود. چون این فرآیند می تواند در دمای پیرامون یا در شرایط یخچال اجرا شود، محصولات معمولا کمتر مواد مغذی، رنگ، طعم و بافت خود را نسبت به روش گرم کردن از دست می دهند.

¹ High hydrostatic pressure

بهره گیری پایدارتر فناوری HHP در صنعت غذا نیازمند درک عمیق تر از تاثیر فشار بر میکروارگانیسم ها می باشد. در این بافت، به دلایل نامعلوم، به نظر می رسد که حساسیت باکتری های نباتی به HHP در میان گونه های مختلف متفاوت است و حتی درون گونه ها نیز ممکن است این حساسیت متغیر باشد. همچنین، به هنگام قرار گرفتن در معرض پردازش HHP مشابه، اختلاف در غیرفعالسازی در میان نژادهای مختلف *Listeria monocytogene* یا *Escherichia coli* وجود دارد. علاوه بر این مطالعات بر روی *Listeria monocytogene* و *Escherichia coli* نشان داد که مقاومت HHP یک ویژگی است که می تواند فراگرفته شود. بدین روی، کاراتزاس و همکاران (13-15) جهش یافته های مقاوم به HHP از *monocytogene Scott A* را از بخش کوچکی از سلولهای زنده مانده در شوک HHP با 400MPa پیدا کردند. این جهش یافته های خودبه خودی در تنظیم گر *CrsR* ناتوان شده بودند که پروتئین های شوک حرارتی نوع 3 را سرکوب می کند و معرفی مجدد ژنهای ناهم سان *CtsR-null* مقاومت HHP در *monocytogene* را اعمال می کنند. جالب اینکه به دلیل تکرار جفتی ناپایدار ژن *CtsR*، مشخص شد که جهش یافته های *ctsR* در واقع یک جمعیت فرعی از قبل موجود را در کشت های فاز ثابت *monocytogene* ایجاد کرده اند که ناشی از باکتری نوع وحشی می باشد و جداسازی خود را پس از شوک منفرد HHP توضیح می دهد. در مقابل، گروه ما جداسازی جهش یافته های مقاوم در برابر HHP نوع *E. coli* را در طی رویکرد غنی سازی انتخابی براساس چرخه های سازه ای شوک های HHP شدید با احیای متناوب و نتیجه ی جمعیت باقی مانده نشان می دهد. در حالی که سطح مقاومت HHP آنها تا حد زیادی بیش از جهش یافته های *monocytogene ctsR* می باشد. این جهش یافته های *E. coli* به صورت مشابه سرکوبی تعدادی از ژن های شوک حرارتی را نشان می دهند. متأسفانه، مبنای ژنتیک این مقاومت شدید HHP در *E. coli* هنوز حل نشده باقی مانده است اگرچه می توان پیش بینی کرد که تعدادی از جهش یافته های مختلف مورد نیاز هستند و جهش یافته های متناظر به صورت پیوسته به صورت طبیعی از قبل در جمعیت *E. coli* نوع وحشی حضور ندارند.

جدول 1

Bacterium or plasmid	Characteristic	Source or reference
Bacteria		
<i>E. coli</i>		
MG1655	Parental strain	8
DVL20	HHP-resistant mutant of MG1655	This work
MG21	MG1655 <i>zde-264::Tn10</i> , parental strain of MG1655A7	29
MG1655A7	MG1655 <i>zde-264::Tn10 hipA7</i> , mutant of MG21 with increased persistence	29
ATCC 11775	Parental strain	ATCC ^a
ATCC 43888	Parental strain, O157:H7 serotype	ATCC ^a
DVL24	HHP-resistant mutant of ATCC 43888 (O157:H7)	This work
536	Parental strain	33
DVL25	HHP-resistant mutant of 536	This work
<i>S. Typhimurium</i> LT2	Parental strain	SGSC ^b
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	Parental strain	ATCC ^a
<i>S. flexneri</i> LMG 10472	Parental strain	BCCM ^c
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610	Parental strain	ATCC ^a
<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	Parental strain	ATCC ^a
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	Parental strain	26
<i>L. innocua</i> LMG 11387	Parental strain	BCCM ^c
Plasmid		
pAA212	<i>dnaK-gfp</i> transcription fusion cloned in pFPV25	1

^a American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

^b *Salmonella* Genetic Stock Center, Calgary, Canada.

^c Belgian Coordinated Collection of Microorganisms, Ghent, Belgium.

مواد و روش ها

نژادهای باکتریایی و شرایط رشد. باکتری های مختلف مورد استفاده در این کار در جدول 1 فهرست شده اند. *E. coli* 536 توسط اریک دنامور (اینسرم U722، پاریس، فرانسه)، در حالی که جهش یافته ی *E. coli* MG1655A7 و نژاد مادری متناظر آن (*E. coli* MG21) توسط ناتالی کوئستمبرت-بالابان (دانشگاه عبری، اورشلیم، اسرائیل).

برخلاف گفته های دیگران، کشت های فاز ثابت توسط رشد هوازی با تکان دادن (200rpm) برای 23 ساعت در TBS (آب سویای تریپتون) در دمای 30 درجه (*Aeromonas Hydrophila*, *pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria innocua*) یا در 37 درجه (*E. coli*, *Salmonella enterica*, *serovars Typhimurium* و *Enteritidis* و *Shigella felxneri*). به هنگام ضرورت، یک غلظت نهایی با $100\mu\text{g/ml}$ برای انتخاب برای وجود pAA212 استفاده شد (کددار کردن ارتقاء دهنده ی جریان رو به بالای شوک گرمایی ژن *dnaK* از ژن پروتئین فلورسنت سبز (جدول 1).

در طی انتقال های سریالی (در غیاب پردازش HHP)، کشت های فاز ثابت به صورت مکرر در TSB از پیش گرم شده رقیق شدند $1/10000$ و به صورت شبانه رشد داده شدند (24 ساعت) تا فاز ثابت بدست آید تا زمانی که رشد متوالی برای نسل های $ca.80$ حاصل شد.

پردازش با HHP سلولهای کشت فاز ثابت توسط سانترفیوژ برداشت شدند ($4000 \times g$; 5min) و در یک حجم مساوی از $0.85\% KCl$ معلق شدند. در نتیجه، 200مول از تعلیق پس از خروج حباب هوا در یک کیف پلی اتیلن استریل به صورت دربسته گرم شد و سپس به مدت 15 دقیقه در ظرف فشار 8ml در معرض فشار بالای هیدرواستاتیک (HHP) قرار گرفت (100 تا 800 MPa) و در دمای 20 درجه به همراه یک آبدان خارجی متصل به کریوستات نگهداری شد. لطفا توجه داشته باشید که افزایش آهسته ی فشار ($100 MPa/min$) و آبدان خارجی گرمایش آدیباتیک را در ایجاد فشار رقیق می کنند و تخمین های محافظه گرایانه تنها نشان دهنده ی افزایش موقتی در دمای نمونه ی کمتر مساوی 13 درجه در فشار 800 MPa هستند. در نهایت، کاهش فشار تقریباً به صورت خودبه خودی رخ می دهد. پس از پردازش HHP، این کشت برای تعیین زیست پذیری استفاده شد. در طی رویه ی انتخاب برای جهش یافته های مقاومت HHP، یک کشت پردازش شده با HHP نیز درون TSB تازه و از پیش گرم شده مایه کوبی (آغشته) شد $100/1$ و به مدت 23 ساعت پیش از دور دوم ایجاد فشار، در دمای مناسب مجدداً رشد داده شد (30 درجه یا 37 درجه).

تعیین زیست پذیری. رقیق سازی های مناسب نمونه در $0.85 KCl$ با $0.1\% peptone$ آماده شدند (نمک فیزیولوژیک پپتون [PPS]) و سپس بر روی قارچ سویای تریپتون (TSA) به صورت گسترده یا نقطه ای اندود شدند. پس از 24 ساعت از انکوباسیون در دمای رشد بهینه برای باکتری های متناظر، این اندودها شمرده شدند و عامل کاهش لگاریتمی به عنوان $\log(N_0/N)$ محاسبه شد که در آن N_0 و N تعداد نجات یافته ها در CFU به ازای ml پیش و پس از پردازش HHP را نشان می دهند. توجه داشته باشید که محدوده ی شناسایی 10 یا 200 CFU/ml برای نمونه های اندود شده ی گسترده یا نقطه ای بود.

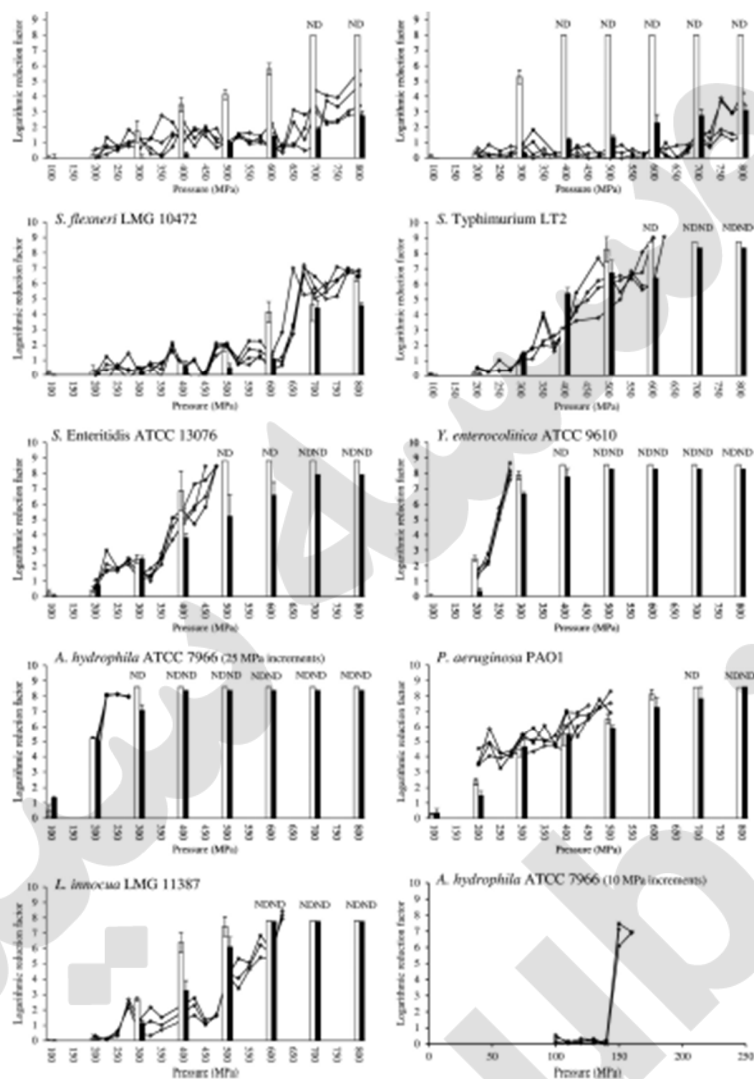
شناسایی منحنی های رشد. به منظور مقایسه ی منحنی های رشد در میان نژادهای مختلف، تراکم چشمی در 600nm(OD600) از کشت های در حال رشد در طی زمان با سیستم صفحه-خوان بیواسکرین² اندازه گیری شد. برای هر آزمایش انجام شده در سیستم بیواسکرین C، پیش کشت های فاز ثابت همانطور که در بالا توصیف شدند، در طی شب رشد پیدا کردند که پس از آن این کشت ها به تقریبا 10 به توان 5 CFU/ml در آب لیسوزنی از پیش گرم شده رقیق شدند. سپس 300 مول از تعلیق متناظر در یک لانه زنبوی قرار داده شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37درجه انکوباسیون شد و در هر 10دقیقه اندازه گیری های خودکار و تکانشی OD600 انجام گرفتند. منحنی های رشد در سه کشت تکراری میانگین گرفته شدند و انحراف معیارها کمتر از 8.5٪ بودند.

اندازه گیری نمود **Pdnak-gfp**. نژادهای E.coli ابتدا با pAA212 (کددار کردن Pdnak-gfp) توسط الکتروپوریشن تبدیل شدند و سپس خالص سازی گردیدند. برای اندازه گیری نمود اساسی Pdnak-gfp، کشت های نژادهای متناظر برای فاز ثابت در LB Ap100 در دمای 37 درجه پیش از تحلیل فلورسنس GFP رشد داده شدند. برای اندازه گیری القاء توسط شوک گرمایی، کشت های ثابت 100/1 در LB Ap100 تازه از پیش گرم شده رقیق شدند و در دمای 37درجه تا اواخر فاز نمایی، انکوباسیون شدند (OD600=0.6). نسبت های (1ml) از این کشت ها توسط سانتریفیوژ به صورت قرص درآمدند و دوباره در حجم یکسان از LB تازه از پیش گرم شده معلق شدند که پس از آن یک نمونه (500مول) در وان آب در دمای 50درجه به مدت 15 دقیقه قرار داده شد. کشت های شوک گرمایی و پردازش نشده در دمای 37 درجه به مدت 5 ساعت پیش از اندازه گیری فلورسنس GFP نگهداری شدند.

برای اندازه گیری فلورسنس GFP، نمونه های 200مولی به ظروف میکروصفحه³ انتقال پیدا کرده و در یک فلوراسکن Ascent FL انتقال داده شدند که پس از آن فلورسنس در 520 nm با استفاده از طول موج تهیج 480nm اندازه گیری شد. مقادیر فلورسنس بدست آمده توسط OD600 از یک نمونه ی یکسان تقسیم شدند و به عنوان واحدهای فلورسنس نسبی ارائه گردیدند.

² Bioscreen C plate-reader system

³ Microplate



شکل 1

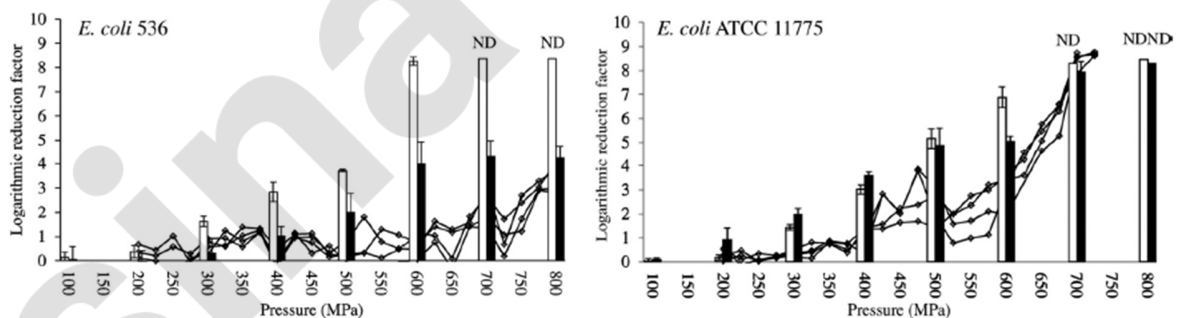
تعیین کسر دائمی با آمپی سیلین. برای تعیین کسر سلول های مقاوم، این روش همانطور که توسط دی گروت و همکاران (6)⁴ توضیح داده شد، اتخاذ گردید. به طور خلاصه، کشت های فاز ثابت 100/1 در 4مول LB تازه ی از پیش گرم شده رقیق شدند که حاوی 100 مول آمپی سیلین می باشد. کشت ها در دمای 37 درجه با تکان دادن به مدت 5 ساعت انکوباسیون شدند که پس از آن نمونه ها به صورت سریالی در PPS رقیق شدند و بر روی آگار LB اندود گردیدند تا باقی مانده ها مشخص شوند.

⁴ De Groot et al

نتایج

توسعه ی مقاومت HHP در پاتوژن های مختلف غذازاد. برای ارزیابی توانایی های ذاتی به منظور تکامل مقاومت حداکثری HHP، پاتوژن های مختلف (از جمله *E. coli*، *S. flexneri*، *S. Typhimurium*، *S. Enteritidis*، *Y. enterocolitica*، *A. hydrophila*، *P. aeruginosa* و *L. innocua*) به صورت منفرد در معرض چرخه های تکراری شوک های HHP شدید به همراه رشد متناوبی باقی مانده ها قرار گرفتند. فشار با 200 MPa آغاز شد و در هر چرخه تا 25 MPa افزایش پیدا کرد و این نظام انتخاب حفظ شد تا زمانی که رشد باکتریایی دیگر پس از پردازش HHP یا فشار بیشینه ی تجهیزات مشاهده نشد (800 MPa). برای هر نژاد ارزیابی شده، چهار کشت مستقل تحت رویه ی بالا قرار گرفتند، که پس از آن 10 دسته ی خالص شده از هر کشت تکامل یافته به صورت منفرد برای مقاومت HHP مورد ارزیابی قرار گرفتند. از این جهش یافته ها، غیرفعالسازی HHP اغلب مشتقات مقاوم با نژاد مادری متناظر آنها مقایسه شد (شکل 1).

انتخاب *E. coli* MG1655 به سمت مقاوت شدید در برابر HHP قبلا نیز نشان داده شده بود و این نژاد به عنوان یک کنترل مثبت در این مطالعه گنجانده شده است. در همخوانی با یافته های قبلی، سطوح بالای پیرومقاومت به صورت تکرارپذیر پس از 25 چرخه ی متوالی پردازش HHP حاصل شدند (شکل 1). در حالی که بقای نژاد مادری *E. coli* MG1655 قبلا در زیر محدوده ی شناسایی در 700 MPa بود، بیشترین مقاومت HHP مشتق آن در این مطالعه تنها 2.8 log چرخه را در 800 MPa کاهش داد.



شکل 2

در نتیجه، ما توسعه ی مقاومت HHP را در *E. coli* O157:H7 و برخی پاتوژن های غذازاد دیگر را از *Enterobacteriaceae* مرتبط ارزیابی کردیم مانند *S. flexneri*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *Y. enterocolitica* (شکل 1). جالب اینکه، از میان این نژادها، *E. coli* O157:H7 به سرعت مقاومت در برابر HHP را به میزان مشابه با *E. coli* MG1655 افزایش داد اگرچه نژاد مادری اصلی به صورت چشمگیر به HHP حساس تر بود. همچنین، نژاد نوع وحشی *S. flexneri*، یک گونه که در حقیقت از *E. coli* قابل تشخیص نیست (11)، پیش از اعمال نظام انتخاب، مقاومت چشمگیری را در برابر HHP از خود نشان داد اگرچه این مقاومت به میزان *E. coli* MG1655 و O157:H7 گسترش پیدا نکرد و منجر به غیرفعالسازی چرخه ی \log 6.4 در 800 MPa شد (شکل یک، ستون های سفید). در مقابل، سطر بندی های رو به تکامل *S. Typhimurium*، *S. Enteritidis*، *Y. enterocolitica* نتوانستند در مقابل نظام انتخاب اعمال شده نتوانستند پیش از رسیدن به 800MPa دوام آورند. بدین روی، تنها مقاومت محدود HHP می تواند در اغلب مشتقات مقاوم *S. Typhimurium*، *S. Enteritidis*، *Y. enterocolitica* که بالا برود در حالی که *Y. enterocolitica* نتوانست مقاومت قابل توجهی را در فشارهای بیش از 400MPa ایجاد کند.

توسعه ی مقاومت HHP در نژادهای مختلف *E. coli*

چون توان برای فراگیری مقاومت HHP بیشینه تا کنون محدود به *E. coli* MG1655 and O157:H7 (شکل 1) بوده است، ما تصمیم گرفتیم تا نژادهای دیگر *E. coli* را ارزیابی کنیم تا ببینیم که آیا این توانایی در میان نژادهای مجزای این گونه جهانی است یا خیر. بدین روی، توسعه ی مقاومت HHP در *E. coli* 536 and ATCC11775 (شکل 2) ارزیابی شد. جالب اینکه، در حالی که مورد اولی به راحتی مقاومت HHP را افزایش داد (غیرفعالسازی چرخه ی \log 4.2 در 800 MPa)، گونه ی ATCC11775 نتوانست این کار را انجام دهد که این امر نشان دهنده ی این مطلب است که همه ی *E. coli* ها در برابر HHP به یک میزان مقاوم نمی شوند.

بار و پایداری خصیصه ی مقاومت HHP.

همچنین، ما پایداری مقاومت شدید HHP را در جهش یافته های تکامل یافته ارزیابی کردیم چون این مسئله ی مهم قبلا مورد بررسی قرار نگرفته است. اول از همه، سطوح تناسب عمومی نوع وحشی E.coli MG1655 و جهش یافته ی مقاوم آن در برابر HHP در این مطالعه براساس منحنی های رشد خود در شرایط استاندارد مقایسه شدند. چون اختلاف چشمگیری در ویژگی های رشد مشاهده نشد، جهش یافته ی E.coli انتخاب شده که در برابر HHP مقاوم است، تحت این شرایط دچار نقص فیزیولوژیک عمده ای نمی شود. علاوه براین، نتایج مشابه نیز برای جهش یافته های مقاوم در برابر HHP از E.coli O157:H7 و 536 حاصل شدند.

سپس ما بررسی کردیم که خصیصه ی مقاومت HHP چگونه می تواند در غیاب HHP به عنوان نیروی انتخابی، حفظ شود. از این رو، ما مقاومت پسماندی نوع وحشی MG1655 و جهش یافته ی مقاوم آن را پس از کشت فرعی 7 رده ی مستقل از هر نژاد برای نسل های ca.80 در غیاب هر گونه استرس HHP، تعیین کردیم. جالب اینکه، اگرچه کشت فرعی به نظر باعث کاهش عمومی در مقاومت HHP در نوع وحشی و نژاد جهش یافته می شود، اما جهش یافته ی مقاوم، هرگز به حساسیت HHP مادرانه بازنگشت (شکل B3). روی هم رفته این یافته ها نشان می دهند که فراگیری مقاومت شدید HHP باری بر روی سلول ایجاد نمی کند و این خصیصه در غیاب فشار انتخابی ایجاد شده توسط HHP به سرعت از بین نمی رود.

بررسی ارتباط احتمالی بین مقاومت HHP و مقاومت E. coli

جالب اینکه، علی رغم توانایی مقاومت جمعیت E. coli برای بقا در برابر شوک شدید HHP، اکثریت عمده (بیش از 90٪ یا چرخه ی 1log) از سلولها هنوز نمی توانند در فشارهای نسبتا متوسط زنده بمانند (شکل 1 و 2، ستون های مشکی). در این بافت، باید توجه داشت که این امکان وجود ندارد که سلولهای زنده مانده از نظر ژنتیکی با مواد غیرفعال شده متفاوت باشند چون آنها به صورت منفرد رشد می کنند تا جمعیتی با حساسیت HHP مشابه با موارد مادری خود تولید کنند. همچنین، آزمایشات غنی سازی انتخابیکه تلاش دارند تا افزایش بقا را در دوز معین از HHP انتخاب کنند نتوانستند بر این فنوتیپ تاثیر بگذارند (شکل 4). چون همه ی سلولها لاجرم دقیقا شوک HHP یکسانی را دریافت می کنند، این مشاهدات بدان معنا خواهند بود که سازوکار مقاومت HHP غایب است یا

در اکثر جمعیت جهش یافته ها کار نمی کند. بدین روی این مشخصه، یادآورنده ی پدیده ی مقاومت باکتریایی هستند که در آن یک کسر کوچک از سلول های کمون از لحاظ متابولیکی در یک جمعیت دسته ای، افزایش مقاومت در برابر استرس های مضر مانند آنتی بیوتیک را نشان دادند.

به منظور ارزیابی درگیری احتمالی پایداری در مقاومت HHP، غیرفعالسازی HHP یک جهش یافته ی *E. coli* MG1655 hipA7، افزایش هزاربرابری کسر سلولهای مقاوم را در مقایسه با نژاد مادری نشان می دهد (شکل 5A). اگرچه افزایش کسر مقاوم بر تعداد بقایافته ها پس از هر شوک HHP تاثیر نداشت. در مقابل ما تعداد مقاوم های موجود در جمعیت *E. coli* MG1655, O157:H7, 536 و جهش یافته های متناظر مقاوم در برابر HHP را تعیین کردیم. اگرچه، از میان جهش یافته های مقاوم *E. coli* DVL24، تنها افزایش 1.8 برابری را در سلولهای مقاوم از خود نشان داد (شکل 5B).

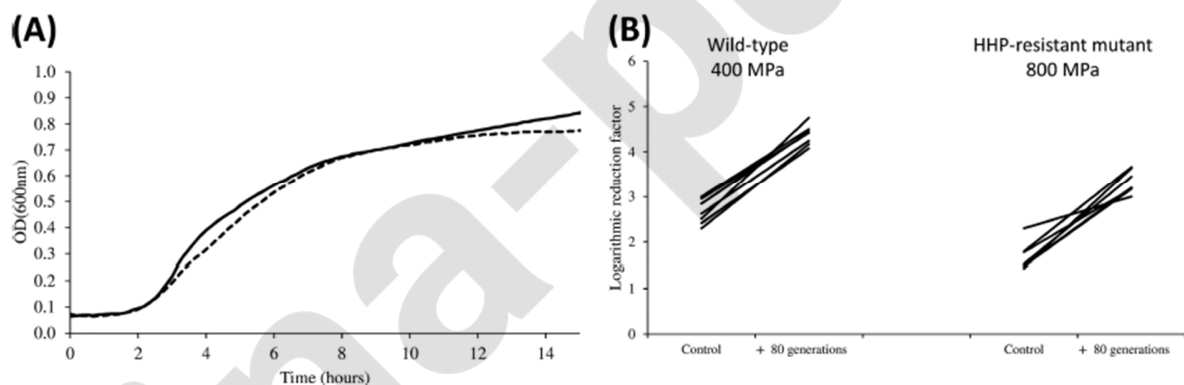
جدول 2

Strain ^a	RFU ^{b,c} noninduced	RFU ^{b,c} induced by heat shock	Ratio of parental strain vs HHP-resistant mutant	Ratio of induced vs noninduced strain
<i>E. coli</i> MG1655/pAA212 (parental strain)	4.9 ± 0.2	28.1 ± 1.2	1.0	5.7
<i>E. coli</i> DVL20/pAA212 (HHP-resistant mutant)	7.5 ± 0.7	13.6 ± 0.5	1.5	1.8
<i>E. coli</i> O157:H7/pAA212 (parental strain)	3.6 ± 0.1	11.8 ± 0.5	1.0	3.3
<i>E. coli</i> DVL24/pAA212 (HHP-resistant mutant)	3.2 ± 0.2	10.3 ± 0.4	0.9	3.2

^a Please note that *E. coli* 536 and its HHP-resistant mutant (DVL25) were not included, as we were unable to transform them with plasmid pAA212.

^b RFU, relative fluorescence units.

^c All data shown are mean values ± standard deviations from an experiment with three independent replicates.



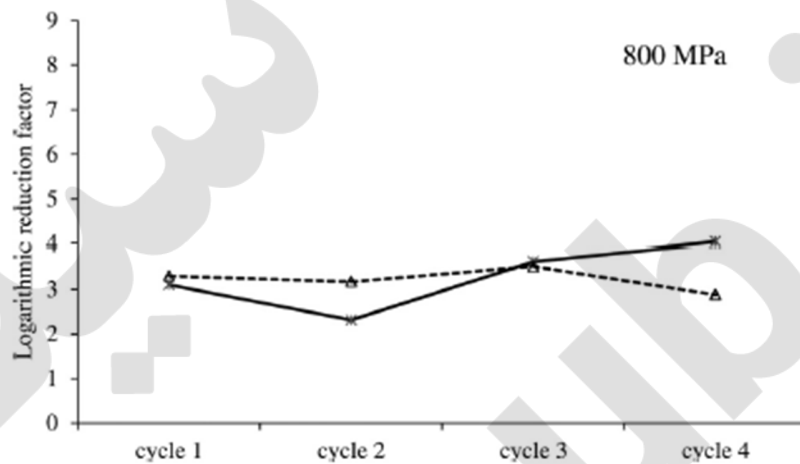
شکل 3

افزایش استفاده از پاستوریزه کردن به روش HHP در صنعت غذا، درک بهتر از توسعه ی مقاومت باکتریایی در برابر این فشار را ضروری کرده است. در حالی که مطالعات قبلی میزان شدت مقاومت HHP در *E.coli* را مورد بررسی قرار داده اند، این مطالعه در مورد پایداری و پایداری مقاومت شدید HHP در پاتوژن های مختلف غذازاد گزارش می دهد.

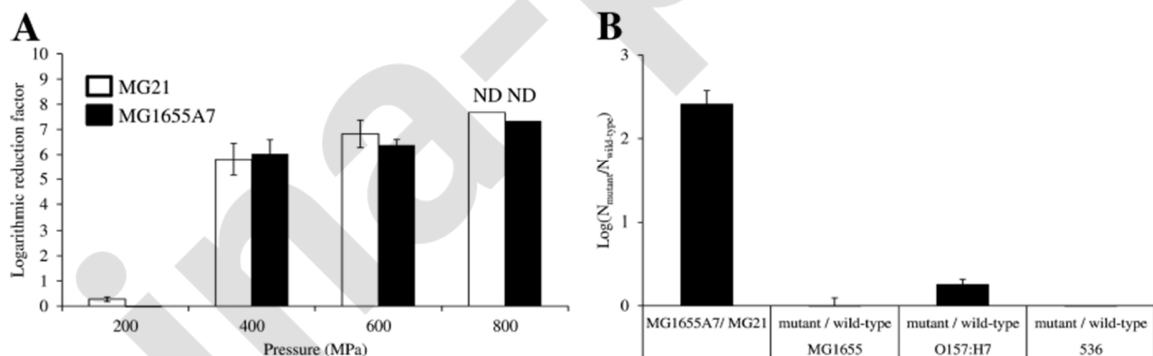
در طی ارزیابی ظرفیت درونی این باکتریها برای توسعه ی مقاومت HHP، ما دریافتیم که فراگیری این خصیصه به نظر محدود به برخی از نژادهای *E.coli* می باشد چون به نظر این مورد در *S. Typhimurium*، *S. flexneri*، *S. Enteritidis*، *Y. enterocolitica*، *A. hydrophila*، *P. aeroginusa* و *L. innocua* غایب بود. علاوه براین، در حالی که اغلب نژادهای *E.coli* به صورت تکرارپذیر برای بقا در 800MPa تکامل پیدا کردند، پاتوژن های مهم و وابسته مانند *S. Typhimurium*، *S. Enteritidis* تنها به مقاومت محدود در برابر فشارهای تا 600MPa دست پیدا کردند. یک استثنای قابل توجه در این بافت توسط *S. flexneri* ارائه شد، یک هم خانواده ی غیرقابل تشخیص از نظر فیلوژنتیکی با *E.coli* که نژاد نوع وحشی آن مقاومت شدید در برابر HHP از خود نشان می دهد. لازم به ذکر است که *E.coli* و *Shigella Spp* تعدادی از پاتوژن های مهم را پرورش می دهند که افزایش مقاومت آنها در برابر HHP، ممکن است امنیت فرآوری HHP در صنعت غذا را به خطر بی اندازد. در حقیقت یک تمایز نمادین از یکی از این پاتوژن ها یعنی O157:H7 جداشده از O157:H7 به سرعت مقاومت HHP را افزایش می دهد.

وقتی که مقاومت HHP در *E.coli* ایجاد شود، تناسب سلولی نه به هم نمی ریزد و نه در طی حداقل 80 نسل در غیاب HHP، بازگشت پیدا می کند. جالب اینکه اگرچه کشت سریالی برای 80 نسل در غیاب HHP حساسیت HHP را در نوع وحشی و جهش یافته های مقاوم در برابر HHP افزایش می دهد، اما نژاد آخری بیش از نژاد مادر مقاوم باقی ماند. اگرچه سازوکار زیرین این مشاهده همچنان نامعلوم است، اما رشد تعویقی در محلول آبی در طی عبور سریالی برای ساخت ژنتیک جایگزین انتخاب شده است.

همچنین مشاهده شد که همه ی جهش یافته های *E.coli* که در برابر HHP مقاوم هستند، یک سرکوب ساختاری پیش بینی شده در برابر شوک گرمایی از خود نشان دادند که قبلا به عنوان یک سازوکار ممکن برای مقاومت HHP پیشنهاد شده بود (1). همچنین، در تکمیل این مشاهدات، یک جهش یافته ی مقاوم در برابر HHP از *E.coli* MG1655 سرکوب ساختاری در برابر شوک گرمایی را از خود نشان داد که با افزایش چشمگیر در HHP همراه نبود. بدین روی، چون نشان داده شده است که پاسخ شوک گرمایی می تواند به صورت موقت مقاومت HHP را در *E.coli* بالا ببرد، رابطه ی تصادفی بین سرکوب ساختاری شوک گرمایی پروتئین ها و فراگیری دوطرفه ی مقاومت HHP نامشخص باقی می ماند.



شکل 4



شکل 5

چون اکثریت سلولهای درون یک جمعیت مقاوم به HHP هنوز نمی توانند در برابر فشارهای نسبتاً متوسط مقاومت کنند و لذا حساس به فشار باقی می ماند، ما تصمیم گرفتیم تا به صورت ویژه درگیری مشخص تداوم در مقاومت HHP را ارزیابی کنیم. تداوم یک پدیده ی مشخص شده در درمان آنتی میکروبی است و به تعداد اندک سلولها درون یک جمعیت دسته ای اشاره دارد که در برابر تاثیرات پردازش های مضر مقاومت می کنند. این صورت ویژه از مقاومت ریشه در کمون متابولیک موقتی سلولهای مقاوم دارد که عدم تنظیم ناشی از استرس در فیزیولوژی سلولی را کاهش می دهد. اگرچه سازوکار دقیق مولکولی در پشت پایداری و تداوم هنوز حل نشده است. همچنین سلولهای E.coli که این جهش را تحمل می کنند و 255 برابر افزایش پایداری در برابر آمپی سیلین را نشان می دهند، هیچ گونه افزایش مقاومت در برابر HHP را از خود نشان ندادند. در مقابل، هیچ کدام از جهش یافته های E.coli جدا شده در این مطالعه، افزایش چشمگیر در جمعیت فرعی مقاوم را نشان ندادند که می تواند ارتجاع آنها در برابر فشار HHP را نشان دهد. بدین روی، این احتمال وجود ندارد که کمون متابولیک که مشخصه ی مقاوم ها است، و آنها را قادر می سازد تا در برابر پردازش آنتی میکروبی زنده بمانند، در بقای HHP نقش داشته باشد.

در میان باکتری های تست شده در این مطالعه، ظرفیت برای توسعه ی مقاومت شدید HHP محدود به گونه های E.coli بود اگرچه همه ی ایزوله های آن این مشخصه را به اشتراک نمی گذارند. وقتی که مقاومت HHP فراگرفته شود، به نظر می رسد که یک ویژگی پایدار باشد و بر تناسب سلولی تاثیری نمی گذارد. همچنین، مقاومت HHP الزاماً به سرکوب پاسخ شوک گرمایی ارتباط ندارد.