تأثیر فاز رشد، نوع اسید و محیط بر مقاومت اسیدی *مرگانلا مرگانی* (*Morganella morganii*) در pHهای مختلف

مهدی زارعی[۱*]، مهدی پورمهدی بروجنی[۱]، شیما نیازی[۲]

۱- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/٤/۸)

چکیده

توانایی باکتری‌ها در تحمل pHهای پایین از جمله خصوصیات مهمی است که به زنده‌مانی باکتری در محیط‌های مختلف کمک می‌نماید. در مطالعه منابع مختلف اطلاعات زیادی در مورد مقاومت اسیدی باکتری‌های مختلف دیده می‌شود اما راجع به مقاومت اسیدی *مرگانلا مرگانی* که مهمترین باکتری تولید کننده هیستامین در ماهی و مواد غذایی دریایی می‌باشد، اطلاعات اندکی در دسترس است. بنابراین در مطالعه حاضر تأثیر فاز رشد، نوع محیط و اسید بر مقاومت اسیدی *مرگانلا مرگانی* در pHهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور سلولهای فاز لگاریتمی و سکون باکتری در محیط‌های TSB و PBS با pHهای پایین (۳، ٤ و ۵) ایجاد شده به‌وسیله اسیدهای کلریدریک، استیک، لاکتیک، سیتریک و تارتاریک به مدت یک ساعت قرار گرفت. درصد زنده‌مانی با تقسیم تعداد سلول‌های زنده باقیمانده بر تعداد اولیه باکتری‌ها بدست آمد. نتایج این تحقیق به طور کلی مقاومت اسیدی بالایی را در این باکتری نشان داد. در مورد همه اسیدهای مورد استفاده با کاهش pH تعداد سلول‌های زنده باقیمانده کاهش یافت. سلولهای فاز سکون *مرگانلا مرگانی* مقاومت اسیدی بیشتری را در مقایسه با سلول‌های فاز لگاریتمی نشان دادند و تفاوت معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) در مقاومت اسیدی این باکتری در محیط‌های TSB و PBS در pHهای مختلف مشاهده نگردید. علاوه بر این اسید استیک و اسید لاکتیک اثر ضد میکروبی بیشتری را نسبت به سایر اسیدهای مورد استفاده بر سلول‌های فاز سکون و لگاریتمی *مرگانلا مرگانی* نشان دادند.

کلیدواژگان: *مرگانلا مرگانی*، مقاومت اسیدی، اسیدهای آلی، اسید استیک، اسید لاکتیک

* مسئول مکاتبات: zarei@scu.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

مرگانلا مرگانی یک باکتری مهاجم فرصت طلب ثانویه است. منابع مختلف به طور پراکنده این ارگانیسم را به عنوان عامل بیماری معرفی کرده‌اند. به عنوان مثال، *مرگانلا مرگانی* عامل آبسه‌های مغزی نوزادان، عفونت‌های نوزادی و آبسه‌ی لوله‌ای- تخمدانی معرفی شده است [۱، ۲، ۳]. گزارش‌ها حاکی از آن است که عفونت *مرگانلا مرگانی* در افراد با ضعف سیستم ایمنی، عامل مننژیت در بیماران ایدزی، میوزیت چرکی، التهاب کوریو آمنیون و تشنجات نوزادی در زنان باردار و عفونت پس از جراحی در زنان مبتلا به دیابت می‌باشد [٤، ٥، ٦، ٧]. اما مهمترین دلیل انجام تحقیقات گسترده از اوایل دهه ۸۰ میلادی تاکنون بر روی این باکتری نقش آن در ایجاد هیستامین در مواد غذایی دریایی و ایجاد مسمومیت هیستامینی یا اسکامبروئید در انسان می باشد. این باکتری توانایی تولید مقادیر زیادی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز را دارد و در نتیجه در مواد غذایی که دارای اسید آمینه هیستیدین به فرم آزاد می باشند (مانند ماهیان خانواده تون ماهیان)، در صورت فراهم بودن شرایط رشد، مقادیر زیادی هیستامین تولید می نماید و باعث ایجاد مسمومیت هیستامینی در انسان می گردد [۸، ۹، ۱۰].

با وجود تحقیقات گسترده و اطلاعات ارزشمندی که در رابطه با رشد و هیستامین‌زایی این باکتری در مواد غذایی دریایی بدست آمده است، در مورد حساسیت و مقاومت این باکتری در شرایط محیطی مختلف و در حضور استرس‌های مختلف از قبیل pHهای نامناسب و ترکیبات ضد میکروبی، اطلاعات بسیار کمی در دسترس است. با توجه به اینکه توانایی باکتری‌ها در تحمل pHهای پایین از جمله خصوصیات مهمی است که به زنده‌مانی باکتری در محیط‌های مختلف کمک می‌نماید، تحقیق حاضر با هدف دستیابی به اطلاعاتی در مورد مقاومت اسیدی *مرگانلا مرگانی* انجام گردید. همچنین با توجه به اینکه در تحقیقات مختلفی ثابت شده است که فاز رشد باکتری و نوع اسید تأثیر به‌سزایی بر پاسخ باکتری به استرس‌های محیطی دارد [۱۱، ۱۲]، تأثیر فاز رشد، نوع اسید و محیط بر مقاومت اسیدی این باکتری در pHهای مختلف مورد توجه قرار گرفت.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- میکروارگانیسم

باکتری *مرگانلا مرگانی* (PTCC 1078) که به صورت کشت ذخیره حاوی گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری می‌شد، جهت فعال سازی به محیط TSB منتقل و به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه شد.

۲-۲- تهیه‌ی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد

جهت تهیه‌ی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* ابتدا منحنی رشد باکتری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس رسم گردید. بدین منظور مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی میکروارگانیسم فعال شده به ۵ میلی‌لیتر محیط TSB تلقیح شد و سپس ۳۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به داخل یکی از حفرات میکروپلیت استریل وارد گردید. میکروپلیت به مدت ٢٤ ساعت درون دستگاه میکروپلیت‌ریدر (Multimode microplate reader, Synergy HT, BioTek) در دمای ۳۵ درجه سلسیوس انکوبه گردید. هر ساعت میزان جذب نوری پس از ۳۰ ثانیه لرزش میکروپلیت در طول موج ٦٠٠ نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده از منحنی رشد، سلول‌های فاز لگاریتمی *مرگانلا مرگانی* پس از ٤ ساعت و سلول‌های فاز سکون این باکتری پس از ١٦ ساعت انکوباسیون در محیط TSB و در دمای ۳۵ درجه سلسیوس به دست آمد.

۲-۳- آماده کردن مایه‌ی تلقیح

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی میکروارگانیسم فعال شده به ۵ میلی‌لیتر محیط TSB تلقیح شد و در دمای C ۳۵° گرمخانه گذاری شد و بعد از مدت زمان ۲۰ ساعت، اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت بر روی محیط Nutrient agar گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۵°C به مدت ٢٤ ساعت گرمخانه گذاری شدند و سپس تعداد باکتری‌های زنده در هر میلی‌لیتر محیط کشت شمارش و محاسبه گردید. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید. با این عمل تعداد باکتری مورد نظر پس از ۲۰ ساعت مشخص گردید. جهت انجام آزمایشات بعدی با رقیق سازی کشت ۲۰ ساعته، دوز مناسب تلقیح یعنی حدود 10^6 cfu/ml تهیه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-٤- بررسی زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* در محیط‌های TSB و PBS با pHهای مختلف

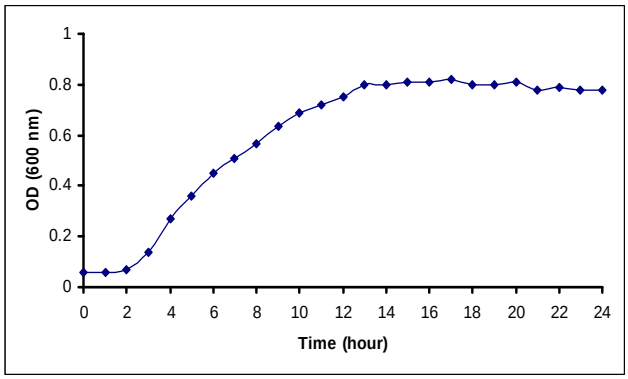
محیط‌های TSB و PBS پس از استریل شدن در اتوکلاو، به وسیله محلولهای غلیظ اسیدهای کلریدریک، استیک، لاکتیک، سیتریک و تارتاریک که به وسیله فیلتر سرنگی ۰/٤٥ میکرون استریل شده بودند، تنظیم pH شدند. بدین منظور حجم مشخصی از هر کدام از اسیدهای استریل شده به محیط‌های مورد نظر افزوده تا محیط‌های TSB و PBS با pHهای ۳، ٤ و ۵ ایجاد شود. پس از تهیه‌ی محیط‌های TSB و PBS با pHهای مورد نظر، سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* با غلظت حدود 10^6CFU/ml به این محیط‌ها تلقیح گردید. قبل از تلقیح به منظور تعیین تعداد اولیه‌ی باکتری‌های تلقیح شده، مایه‌ی تلقیح پس از رقیق‌سازی متوالی بر روی محیط TSA کشت گردید. محیط‌های TSB و PBS تلقیح شده به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سلسیوس قرار داده شد و سپس به منظور تعیین تعداد باکتری-های زنده باقیمانده اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت بر روی محیط TSA گردید. کلیه‌ی مراحل ذکر شده در سه تکرار صورت گرفت.

۲-۵- آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و آزمون آماری One-Way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

این مطالعه با هدف بررسی زنده‌مانی سلول‌های فاز سکون و لگاریتمی رشد *مرگانلا مرگانی* در pHهای مختلف ایجاد شده توسط اسیدهای کلریدریک، استیک، سیتریک، لاکتیک و تارتاریک در دو محیط TSB و PBS انجام شد. میزان زنده-مانی باکتری با تقسیم تعداد سلول‌های زنده‌ی شمارش شده به تعداد باکتری‌های اولیه (زمان صفر) محاسبه گردید. جهت تهیه سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد از منحنی رشد باکتری در دمای ۳۵ درجه سلسیوس استفاده گردید (تصویر ۱).



شکل ۱ منحنی رشد *مرگانلا مرگانی* در دمای ۳۵ درجه سلسیوس

همانطور که در جدول ۱ دیده می شود زنده‌مانی سلول‌های فاز سکون و لگاریتمی باکتری، صرف نظر از نوع اسید مورد استفاده، با کاهش pH محیط‌های TSB و PBS، کاهش یافت و در کلیه‌ی pHهای مورد آزمایش میزان زنده‌مانی این سلول‌ها در حضور اسیدهای آلی کمتر از اسید کلریدریک بود ($p<۰/۰۵$). این مسأله ثابت شده است که pH نامناسب حداقل به دو علت تنفس سلول را تحت تأثیر قرار می‌دهد. یکی اختلال در عمل آنزیم‌ها و دیگری اختلال در انتقال مواد مغذی به داخل این سلول‌ها. غشاء سیتوپلاسمی باکتری‌ها نسبت به یون‌های H^+ و OH^- نفوذناپذیر می‌باشد و علی‌رغم تغییرات شدید در pH محیط پیرامون خود، pH داخل خود را ثابت و در حد pH خنثی نگه می‌دارد [۱۳]. بر خلاف پروتون‌ها و سایر مولکول‌های باردار، مولکول‌های چربی‌دوست غیریونیزه‌ی اسیدهای آلی می‌توانند آزادانه از غشاء عبور کنند. اسیدهای آلی (ضعیف) به دلیل این‌که از pK_a بالاتری برخوردارند دارای اثرات ضدمیکروبی بیشتری در مقایسه با اسیدهای قوی مثل اسید کلریدریک می‌باشند. در مقادیر pH بالاتر از pK_a، مقدار فرم یونیزه‌ی اسید افزایش می‌یابد و در مقادیر pH پایین‌تر از pK_a، مقدار فرم غیریونیزه‌ی اسید افزایش می‌یابد. بنابراین در محیط‌هایی با pH پایین که مقدار فرم غیریونیزه اسید زیاد است، این مولکول‌های تفکیک نشده‌ی اسید به راحتی وارد سلول باکتری می‌شوند و در داخل سیتوپلاسم باکتری که pH بالاتری نسبت به pK_a اسید آلی دارد، تعادل به سمت فرم

Archive of SID
www.SID.ir

یونیزه شده تغییر می‌یابد و یونیزه شدن اسید منجر به تولید پروتون‌هایی می‌گردد که موجب اسیدی شدن سیتوپلاسم باکتری می‌گردد. سلول باکتری سعی می‌کند که با مصرف پروتون در طی فرآیندهایی نظیر تبدیل گلوتامات به گاماآمینوبوتیریک اسید، تبدیل لایزین به کاداورین و یا تبدیل آرژنین به آگماتین، pH سیتوپلاسم خود را در حد خنثی نگه دارد [۱٤، ۱۵]. بنابر این در حضور اسیدهای آلی سلول باکتری انرژی زیادی را صرف مقابله با آن و تنظیم pH داخلی خود می‌نماید که این مسأله در ابتدا باعث کاهش یا توقف رشد سلول و در ادامه می‌تواند به مرگ باکتری منجر شود. البته بایستی ذکر کرد که علاوه بر اثر pH به تنهایی و اثر pK_a و مقدار فرم غیریونیزه‌ی اسید که هر دو حائز اهمیت می‌باشند، ماهیت آنیون اسید آلی نیز در میزان اثرگذاری آن بر باکتری‌ها مؤثر است. این بدین معنی است که فعالیت ضدمیکروبی اسیدهای آلی مختلف حتی در شرایط مشابه از نظر pH و میزان یونیزه شدن، می‌توانند با هم تفاوت داشته باشند. در این رابطه می‌توان گفت که میزان سمی بودن آنیون اسیدهای آلی مختلف و نیز بخشی از سلول باکتری که ممکن است تحت تأثیر این آنیون قرار گیرد، در مورد اسیدهای آلی مختلف، متفاوت است [۱٦].

بر اساس نتایج تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری در زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی *مرگانلا مرگانی* در pH=۵ (جدول ۱) ایجاد شده توسط اسیدهای آلی مختلف مشاهده نشد اما با کاهش pH به ٤ (جدول ۲) و ۳ (جدول ۳)، اثر ضدمیکروبی بیشتری در حضور اسید استیک و اسید لاکتیک در مقایسه با دو اسید دیگر مشاهده گردید. همچنین با مشاهده نتایج می‌توان به اثر بیشتر اسیدهای استیک و لاکتیک بر زنده‌مانی سلول‌های فاز سکون *مرگانلا مرگانی* در مقایسه با اسیدهای تارتاریک و سیتریک پی برد. Raftari و همکاران در سال ۲۰۰۹ ، با مطالعه اثر اسیدهای آلی مختلف بر روی *اشریشیا کلای* $O_{157}:H_7$ و *استافیلوکوکوس آرئوس*، بیشترین اثر ضدمیکروبی را به ترتیب در مورد اسید فرمیک، اسید لاکتیک و اسید استیک در مقایسه با سایر اسیدهای آلی مشاهده نمودند [۱۷]. Chaveerach و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز نشان دادند که زنده‌مانی *کمپیلوباکتر ژژونی* در pH=٤ و در حضور اسیدهای آلی فرمیک، پروپیونیک و استیک به سرعت کاهش می‌یابد و همچنین ترکیب دو اسید آلی با هم، اثرات ضدمیکروبی بیشتری را ایجاد می‌نماید [۱۸].

نتایج همچنین نشان داد که سلول‌های فاز لگاریتمی باکتری حساسیت بیشتری نسبت به شرایط اسیدی و pHهای پایین در مقایسه با سلول‌های فاز سکون دارند. این مسأله در تحقیقات مختلفی ثابت شده است که متابولیسم باکتری در فازهای مختلف رشد متفاوت است و در هر فاز رشد، ژن‌های خاصی بیان می‌شوند. بیان ژن‌هایی مانند ***SigB***، ***rpoS***، ***lacZ***، ***Cis2***، ***gadA*** و ***gadB*** در فاز سکون رشد که همگی با تولید فاکتورهای سیگمای خاص به طریقی باعث افزایش مقاومت اسیدی باکتری می‌شوند در مطالعات مختلفی ثابت شده است به عنوان مثال فاکتور سیگمایی که به وسیله ژن ***rpoS*** کد می‌گردد، باعث افزایش تولید آنزیم کاتالاز در فاز سکون رشد می‌گردد که این مسآله به افزایش مقاومت اسیدی باکتری منجر می‌گردد [۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲].

Gorden و Small در سال ۱۹۹۳ بیان کردند که مقاومت اسیدی *شیگلا* علاوه بر pH و مدت زمان تماس، به فاز رشد باکتری نیز وابسته است و این باکتری در فاز رشد لگاریتمی حساسیت بیشتری به شرایط اسیدی دارد [۲۳]. همچنین Benjamin و Datta در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که مقاومت اسیدی سویه‌های انتروهموراژیک *اشریشیا کلای* وابسته به فاز رشد باکتری و pH محیط است و مقاومت این باکتری در فاز سکون رشد بیشتر از فاز لگاریتمی می‌باشد [۲٤]. Cotter و Hill نیز در سال ۲۰۰۳ دریافتند که میزان زنده‌مانی *لیستریا مونوسایتوژنز* در شرایط اسیدی به فاز رشد این باکتری وابسته است به طوری‌که سلول‌های فاز سکون در pH=۳/۵ به مدت ٦۰ دقیقه زنده ماندند اما سلول‌های فاز لگاریتمی در شرایط مشابه به میزان ۲/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافتند [۲۵].

در تحقیق حاضر تفاوت معنی‌داری در مقاومت اسیدی *مرگانلا مرگانی* در محیط‌های TSB و PBS مشاهده نگردید. اگرچه که در مطالعه منابع در دسترس، هیچ‌گونه گزارشی در مورد مقایسه مقاومت اسیدی این باکتری و یا باکتری‌های دیگر در

www.SID.ir

این دو محیط خاص، به دست نیامد اما انتظار می‌رفت که با توجه به وجود مواد مغذی در محیط TSB، باکتری در این محیط مقاومت بیشتری را در مقایسه با محیط PBS نشان می‌داد. اگرچه که احتمال مشاهده تفاوت معنی‌دار بین دو محیط مورد آزمایش در صورت افزایش مدت زمان تماس باکتری با محیط اسیدی و نمونه‌گیری در زمان‌های متوالی مطرح است اما جهت ارائه توجیهی مناسب برای این یافته، نیاز به ادامه تحقیقات در این زمینه می‌باشد.

جدول ۱ درصد زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون مرگانلا مرگانی در pH=۵ ایجاد شده توسط اسیدهای مختلف

فاز رشد	درصد زنده‌مانی									
	اسید کلریدریک		اسید استیک		اسید سیتریک		اسید لاکتیک		اسید تارتاریک	
	TSB	PBS	TSB	PBS	TSB PBS		TSB	PBS	TSB	PBS
لگاریتمی	۵۷/۲±۱۹/۶ a,A	۶۴/۹±۲۶ a,A	۱۴/۷±۲/۷ a,B	۱۳/۸±۳/۱ a,B	۱۹/۳±۲/۴ a,B	۱۷/۲±۳/۳ a,B	۱۷/۸±۲/۹ a,B	۱۵/۹±۱/۷ a,B	۲۰/۲±۴/۱ a,B	۲۱/۱±۶/۱ a,B
سکون	۷۷/۴±۷/۶ b,A	۷۷/۶±۱۷/۲ b,A	۳۹/۲±۴/۱ b,B	۳۱/۳±۴/۲ b,B	۴۳/۱±۵/۱ b,C	۴۱/۸±۴/۲ b,C	۳۹/۱±۴/۵ b,B	۳۵/۱±۳/۸ b,B	۴۹/۲±۶/۱ b,C	۴۴/۴±۹/۱ b,C

– اعداد ارائه شده در جدول میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مجزا می‌باشند.
– اعداد مربوط به یک ستون که حروف انگلیسی کوچک (a و b) غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.
– اعداد مربوط به یک ردیف برای محیط کشت یکسان که حروف انگلیسی بزرگ (A و B و C) غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۲ درصد زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون *مرگانلا مرگانی* در pH=۴ ایجاد شده توسط اسیدهای مختلف

فاز رشد	درصد زنده‌مانی									
	اسید کلریدریک		اسید استیک		اسید سیتریک		اسید لاکتیک		اسید تارتاریک	
	TSB	PBS	TSB	PBS	TSB	PBS	TSB	PBS	TSB	PBS
لگاریتمی	۲۷/۳±۶ a,A,Δ	۲۴/۳±۳ a,A,Δ	۴/۴±۱ a,B,Δ	<۰/۱ a,B,▲	۵/۸±۰/۸ a,B,Δ	۵/۴±۱/۲ a,C,Δ	۵/۲±۱/۹ a,B,Δ	۴/۷±۱/۳ a,C,Δ	۵/۱±۰/۳ a,B,Δ	۵±۱/۵ a,C,Δ
سکون	۶۰/۹±۷/۱ b,A,Δ	۶۴/۶±۷/۸ b,A,Δ	۱۱/۲±۵ b,B,Δ	۱۹/۶±۲/۱ b,B,Δ	۹/۴±۱/۶ b,B,Δ	۱۰±۱/۳ b,C,Δ	۱۲/۱±۳ b,B,Δ	۱۴/۶±۱/۹ b,B,Δ	۱۰/۴±۱/۴ b,B,Δ	۱۰/۸±۱/۳ b,B,Δ

– اعداد ارائه شده در جدول میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مجزا می‌باشند.
– اعداد مربوط به یک ستون که حروف انگلیسی کوچک (a و b) غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.
– اعداد مربوط به یک ردیف برای محیط کشت یکسان که حروف انگلیسی بزرگ (A و B و C) غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.
– اعداد مربوط به یک ردیف برای هر اسید مورد استفاده که دارای علامت غیر مشابه (Δ و ▲) می‌باشند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳ درصد زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون *مرگانلا مرگانی* در pH=۳ ایجاد شده توسط اسیدهای مختلف

فاز رشد	درصد زنده‌مانی									
	اسید کلریدریک		اسید استیک		اسید سیتریک		اسید لاکتیک		اسید تارتاریک	
	TSB	PBS	TSB PBS		TSB	PBS	TSB	PBS	TSB	PBS
لگاریتمی	۱۲/۱±۳/۵ a,A,Δ	۹/٤±۱/۲ a,A,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	۲/۷±۰/۲ a,C,Δ	۲/۳±۰/۳ a,C,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	۲/۵±۰/٦ a,C,▲
سکون	۳۷/۳±٤/٦ b,A,Δ	۳۵/۱±۵/۹ b,A,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	۳/۹±۰/٤ a,C,Δ	۳/٦±۰/۵ a,C,Δ	<۰/۰۱ a,B,Δ	۳/۷±۰/۹ b,C,▲	٤/۱±۰/٤ b,C,Δ	٤/٤±۰/۵ b,C,Δ

– اعداد ارائه شده در جدول میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مجزا می‌باشند.

– اعداد مربوط به یک ستون که حروف انگلیسی کوچک (aوb) غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می

– اعداد مربوط به یک ردیف برای محیط کشت یکسان که حروف انگلیسی بزرگ (Aو B و C) غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند

– اعداد مربوط به یک ردیف برای هر اسید مورد استفاده که دارای علامت غیر مشابه (Δ و ▲) می‌باشند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق به طور کلی مقاومت اسیدی بالایی را در *مرگانلا مرگانی* نشان داد. در مورد همه اسیدهای مورد استفاده با کاهشpH تعداد سلول‌های زنده باقیمانده کاهش یافت. سلولهای فاز سکون *مرگانلا مرگانی* مقاومت اسیدی بیشتری را در مقایسه با سلول‌های فاز لگاریتمی نشان دادند و تفاوت معنی‌داری در مقاومت اسیدی این باکتری در محیط‌های TSB و PBS در pHهای مختلف مشاهده نگردید. علاوه بر این اسیدهای استیک و لاکتیک اثر ضد میکروبی بیشتری را نسبت به سایر اسیدهای مورد استفاده بر سلول‌های فاز سکون و لگاریتمی *مرگانلا مرگانی* نشان دادند.

۵- منابع

[1] Verboon-Maciolek, M., Vandertop, W.P., Peters, A.C.B., Roord, J.J. and Geelen, SPM. 1995. Neonatal brain abscess caused by *Morganella morgagni*. Clinical Infectious Disease, 20, 471.

[2] Salen, P.N. and Eppes, S. 1997. *Morganella morganii*, a newly reported, rare cause of neonatal sepsis. Academic Emergency Medicine, 4, 711-714.

[3] Pomeranz, A., Korzets, Z., Eliakim, A., Pomeranz, M., Uziel, Y. and Wolach, B. 1997. Relapsing Henoch-Schonlein purpura associated with a tuboovarian abscess due to *Morganella morganii*. American Journal of Nephrology, 17, 471-473.

[4] Mastroianni, A., Coronado, O. and Chiodo, F. 1994. *Morganella morganii* meningitis in a patient with AIDS. Journal of Infection, 29, 356-357.

[5] Arranz-Caso, J.A., Cuadrado-Gomez, L.M., Romanik-Cabrera, J. and Garcia-Tena, J. 1996. Pyomyositis caused by *Morganella morganii* in a patient with AIDS. Clinical Infectious Disease, 22(2), 372-373.

[6] Johnson, J.R. and Feingold, M. 1998. Case of chorioamnionitis in an immunocompetent woman caused by *Morganella morganii*. Journal of Maternal-Fetal Medicine, 7, 13-14.

[7] Gebhart-Mueller, Y., Mueller, P. and Nixon, B. 1998. Unusual case of postoperative infection caused by Morganella morganii. Journal of Foot and Ankle Surgery, 37, 145-147.

[8] Kim, S. H., Ben-Gigirey, B., Barros-Velazquez, J., Price, R. J. An, H., 2000. Histamine and biogenic amine production by *Morganella morganii* isolated from temperature-abused albacore. Journal of Food Protection, 63(2), 244-251.

Archive of SID
www.SID.ir

Staphylococcus aureus Contaminated Meat. The Open Microbiology Journal, 3: 121-127.

[18] Chaveerach, P., Keuzenkamp, D.A., Urlings, H.A.P., Lipman, L.J.A. and van Knapen, F. 2002. In Vitro Study on the Effect of Organic Acids on *Campylobacter jejuni/coli* Populations in Mixtures of Water and Feed. Poultry Science, 81, 621–628.

[19] Siegele, D.A and Kolter, R. 1992. Life after log. Journal of Bacteriology, 174, 345-348.

[20] Oliver, H.F., Orsi, R.H., Wiedmann, M., and Boor, K.J. 2010. *Listeria monocytogenes* σ^B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. Applied and Environmental Microbiology, 76, 4216–4232.

[21] Shin, J.H., Brody, M.S., and Price, C.W. 2010. Physical and antibiotic stresses require activation of the RsbU phosphatase to induce the general stress response in *Listeria monocytogenes*. Microbiology, 156, 2660–2669.

[22] Davis, M.J., Coote, P.J., and O'Byrne, C.P. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes:* the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. Microbiology, 142, 2975-2982.

[23] Gorden, J. and Small, P.L.C. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. Infection and Immunity, 61, 364–367.

[24] Benjamin, M.M. and Datta, A.R. 1995. Acid tolerance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli.* Applied and Environmental Microbiology, 61, 1669–1672.

[25] Cotter, D.P. and Hill, C. 2003. Surviving the acid Test: Responses of Gram-Positive bacteria to low pH. Microbiology and Molecular Biology, 3, 429–453.

[9] Kim, S.H., Field, K.G., Morrissey, M.T., Price, R.J., Wei, C.I and An, H. 2001. Source and identification of histamine –producing bacteria from temperature-abused albacore. Journal of Food Protection, 64, 1035-1044.

[10] Lehane, L. and Olley, J. 2000. Histamine fish poisoning revisited. International Journal of Food Microbiology, 58, 1-37.

[11] Mcmahon, C.M.M., Byrne, C.M., Sheridan, J.J., Mcdowell, D.A., Blair, I.S. and Hegarty, T. 2000. The effect of culture growth phase on induction of the heat shock response in *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes.* Journal of Applied Microbiology, 89, 198–206.

[12] Yeung, P.S. and Boor. K.J. 2004. Effects of acid stress on *Vibrio parahaemolyticus* survival and cytotoxicity. Journal of Food Protection, 67(7), 1328-34.

[13] Jay, J. M., 2000. Modern Food Microbiology, 6th ed. Aspen Publishers, Bakar Batu, Singapor.

[14] Meng, S.Y. and Bennett, G.N. 1992. Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* cad operon: a system for neutralization of low extracellular pH. Journal of Bacteriology, 174, 2659–2669.

[15] Park, G.W. and Diez-Gonzalez, F. 2004. A novel glutamate-dependent acid resistance among strains belonging to the *Proteeae* tribe of *Enterobacteriacea*. FEMS Microbiology, 237, 303–309.

[16] Mani-lopez, E., Garcia, H.S. and Lopez-Malo, A. 2011. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. Food Research International, 45, 713–721.

[17] Raftari, M., Azizian Jalilian F., Abdulamir, A.S., Son, R., Sekawi, Z. and Fatimah, AB. 2009. Effect of Organic Acids on *Escherichia coli* O157:H7 and

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of growth phase, type of acid and medium on acid tolerance of *Morganella morganii* at different pHs

Zarei, M. [1*], Pourmahdi Borujeni, M. [1], Niazi, Sh. [2]

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz
2. Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz

(Received: 91/10/23 Accepted: 92/4/8)

The ability of bacteria to tolerate low pH is a very important trait to survive in a variety of environments. In the literature, there is a lot of information about the acid tolerance of different bacteria. However, little is known about the acid tolerance of *Morganella morganii*, the most prolific histamine former in fish and seafood products. Therefore, in the present study, the effect of growth phase, type of acid and medium on the acid tolerance of *M. morganii* at different pHs were evaluated. To achieve this purpose, cells of *M. morganii* in exponential or stationary growth phases were exposed to low pHs (3, 4 and 5) adjusted by adding hydrochloric, acetic, lactic, citric or tartaric acids into TSB or PBS for one hour. Survival percentage was obtained by dividing the surviving population by the initial population. In general, results of the present study showed a high acid tolerance of *M. morganii*. For all the acids tested, the lower the pH of the mediums used, the lower the survival percentage observed. Cells of *M. morganii* in the stationary phase were more resistant to acidic conditions tested and no significant difference was observed ($p<0.05$) in the acid tolerance of *M. morganii* in TSB and PBS at different pHs. In addition, acetic acid and lactic acid showed more antimicrobial effect on both the stationary and exponential phase cells than the other acids use.

Key words: *Morganella morganii*, Acid tolerance, Organic acids, Acetic acid, Lactic acid

Archive of SID

* Corresponding Author E-Mail Address: zarei@scu.ac.ir

www.SID.ir