ارزیابی امکان حساس کردن *مرگانلا مرگانی* به شرایط اسیدی به وسیله‌ی اتانول و EDTA

مهدی زارعی[۱*]، مهدی پورمهدی‌بروجنی[۱] و سیدعلی جزایری[۲]

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۲

چکیده

توانایی باکتری‌ها در تحمل pHهای پایین از جمله خصوصیات مهمی است که به زنده‌مانی باکتری در محیط‌های مختلف کمک می‌نماید. *مرگانلا مرگانی* که مهم‌ترین باکتری تولید کننده‌ی هیستامین در ماهی و مواد غذایی دریایی می‌باشد، توانایی زیادی در زنده‌مانی در محیط‌های اسیدی دارد. در مطالعه‌ی حاضر توانایی اتانول و EDTA جهت حساس کردن *مرگانلا مرگانی* به pHهای پایین و اسیدهای آلی مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون باکتری در محیط TSB با pH برابر با ۵ ایجاد شده به وسیله‌ی اسیدهای کلریدریک، استیک، لاکتیک، سیتریک و تارتاریک و در حضور اتانول (۵ درصد) و یا EDTA (۷/۵ میلی‌مولار) به مدت یک ساعت قرار گرفتند. درصد زنده‌مانی با تقسیم تعداد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده بر تعداد اولیه‌ی باکتری‌ها به دست آمد. بر اساس نتایج این تحقیق غلظت ۵ درصد اتانول باعث حساس شدن سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* نسبت به شرایط اسیدی شدند ($p<۰/۰۵$). نتایج مشابهی در مورد غلظت ۷/۵ میلی‌مولار EDTA به دست آمد. استفاده هم‌زمان اتانول و EDTA اثرات قوی‌تری را بر مقاومت اسیدی این باکتری نشان داد ($p<۰/۰۵$) به طوری که در حضور هم‌زمان این دو عامل، کم‌ترین میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* مشاهده گردید. بنابراین اتانول و EDTA، به تنهایی یا توأم، می‌تواند میزان غیر فعال شدن *مرگانلا مرگانی* در مواجهه با pH پایین و اسیدهای آلی را افزایش دهد. هم‌چنین در مطالعه‌ی حاضر به طور کلی سلول‌های فاز لگاریتمی *مرگانلا مرگانی* حساسیت بیش‌تری را نسبت به شرایط اسیدی در مقایسه با سلول‌های فاز سکون نشان دادند ($p<۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: *مرگانلا مرگانی*، اتانول، مقاومت اسیدی، EDTA

مقدمه

مرگانلا مرگانی[۱] یک باکتری مزوفیل از جنس *مرگانلا* و خانواده‌ی *انتروباکتریاسه*[۲] می‌باشد. این باکتری در ابتدا عامل اسهال تابستانه معرفی شد و پس از آن ایجاد کننده‌ی امراض معده‌ای- روده‌ای (Muller 1986)، آبسه‌های مغزی نوزادان (Verboon-Maciolek et al. 1995)، عفونت‌های نوزادی (Salen and Eppes 1997) و آبسه‌ی لوله‌ای-تخمدانی[۳] معرفی شد (Pomeranz et al. 1997). گزارش‌ها حاکی از آن است که عفونت *مرگانلا مرگانی* در افراد با ضعف سیستم ایمنی، عامل مننژیت (Mastroianni et al. 1994) در بیماران ایدزی، التهاب کوریوآمنیون و میوزیت چرکی[۴] (Arranz-Caso et al. 1996)، تشنجات نوزادی[۵] در زنان باردار (Johnson and feinglod 1998) و عفونت پس از جراحی در زنان مبتلا به دیابت (Gebhart-muller et al. 1998) می‌باشد. اگرچه *مرگانلا مرگانی* به

[۱*] دانشیار گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز E-mail: zarei@scu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] دانش‌آموخته دکترای حرفه‌ای، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز

1- *Morganella morganii*
2- *Enterobacteriaceae*
3- Tubo-ovarian abscess
4- Pyomyositis
5- Neonatal seizures

عنوان یک باکتری مهاجم فرصت طلب در ایجاد بیماری‌های مذکور و ایجاد عفونت در بیماران ضعف ایمنی نقش دارد، اما مهم‌ترین دلیل انجام تحقیقات گسترده از اوایل دهه‌ی ۸۰ تاکنون روی این باکتری، نقش آن در ایجاد مسمومیت هیستامینی[1] یا مسمومیت اسکامبروئید[2] می‌باشد.

نتایج تحقیقات اندکی که در رابطه با مقاومت اسیدی *مرگانلا مرگانی* انجام شده است، مقاومت اسیدی بالایی را در این باکتری نشان می‌دهد. Young و همکاران در سال ۱۹۹۶ مقاومت اسیدی بالای این باکتری را به وجود آنزیم اوره‌آز بسیار قدرتمندی در باکتری نسبت دادند، که تنها در pHهای پایین فعال می‌گردد و با هیدرولیز اوره و تولید آمونیاک، علاوه بر جلوگیری از کاهش pH داخلی باکتری، با ترشح آمونیاک به خارج سلول باعث افزایش pH محیط پیرامون باکتری نیز می‌گردد. این عمل به زنده‌مانی باکتری در محیط‌های اسیدی کمک می‌نماید. Park و Diez-Gonzale در سال ۲۰۰۴ نیز بیان کردند که *مرگانلا مرگانی* توانایی زنده‌مانی در pH=۲ را در صورت حضور گلوتامات در محیط دارد. آن‌ها دریافتند که بر خلاف بسیاری از باکتری‌های دیگر نظیر *اشریشیا کلای* که سیستم مقاومت به اسید وابسته به گلوتامات آن، با تولید گاما-آمینوبوتیریک اسید از گلوتامات، باعث زنده‌مانی باکتری در محیط‌های اسیدی می‌گردد، *مرگانلا مرگانی* علی‌رغم نیاز به حضور گلوتامات در محیط جهت زنده-مانی در pH=۲، میزان بسیار کمی گاما-آمینوبوتیریک اسید تولید می‌نماید و در حقیقت *مرگانلا مرگانی* آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز و ژن کدکننده‌ی آن یعنی *gadAB* را ندارد. این یافته نشان داد که *مرگانلا مرگانی* دارای یک سیستم مقاومت به اسید وابسته به گلوتامات جدید است که مشابهتی با موارد کشف شده در سایر باکتری‌ها ندارد.

با توجه به اهمیت مقاومت اسیدی باکتری‌ها از نقطه نظر کنترل آن‌ها در مواد غذایی، محققین مختلفی به روش‌های افزایش حساسیت پاتوژن‌های غذایی مقاوم به اسید، نسبت به شرایط اسیدی توجه نموده‌اند.

بنابراین با توجه به عدم وجود اطلاعات در مورد امکان حساس کردن *مرگانلا مرگانی* به شرایط اسیدی، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی امکان حساس کردن این باکتری به شرایط اسیدی به وسیله‌ی اتانول و EDTA انجام گردید.

مواد و روش کار

میکروارگانیسم

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

تهیه‌ی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد[3]

جهت تهیه‌ی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* ابتدا، منحنی رشد باکتری در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 ۲۴ ساعت درون دستگاه میکروپلیت‌ریدر در دمای ۳۵ درجه-ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. هر ساعت میزان جذب نوری پس از ۳۰ ثانیه لرزش میکروپلیت در طول موج ۶۰۰ 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 ۴ ساعت

1- Histamine poisoning
2- Scombroid poisoning

و سلول‌های فاز سکون این باکتری پس از ۱۶ ساعت انکوباسیون در محیط TSB و در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به دست آمد (Chiang and Chou 2009).

انتخاب غلظت غیرکشنده‌ی اتانول و EDTA

به منظور انتخاب غلظت غیر کشنده‌ی اتانول و EDTA، تأثیر غلظت‌های مختلف این دو ترکیب بر *مرگانلا مرگانی* مورد بررسی قرار گرفت. بدین صورت که باکتری با دوز تلقیح حدود $۱۰^{۶}$ cfu/ml به محیط‌های کشت TSB حاوی غلظت‌های صفر، ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵ و ۱۰ درصد اتانول و نیز محیط‌های کشت TSB حاوی غلظت‌های صفر، ۲/۵، ۵/۰، ۷/۵ و ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار EDTA تلقیح گردید. بلافاصله قبل از تلقیح و پس از مدت زمان یک ساعت که باکتری در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید، اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت باکتری بر روی محیط TSA شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس اقدام به شمارش باکتری‌ها گردید. بر اساس نتایج این بخش، غلظت غیرکشنده اتانول و EDTA جهت استفاده در بخش بعدی تحقیق انتخاب گردید (Chiang et al. 2008).

بررسی تأثیر اتانول و EDTA در افزایش حساسیت *مرگانلا مرگانی* نسبت به شرایط اسیدی

جهت بررسی تأثیر یا عدم تأثیر غلظت غیرکشنده‌ی اتانول و EDTA در افزایش حساسیت *مرگانلا مرگانی* نسبت به شرایط اسیدی، باکتری مذکور با دوز تلقیح $۱۰^{۶}$ CFU/ml به محیط TSB با pH برابر با ۵ که به وسیله‌ی اسیدهای کلریدریک، استیک، لاکتیک، سیتریک و تارتاریک ایجاد شده است (گروه کنترل) و نیز محیط‌هایی با شرایط مشابه اما حاوی غلظت غیر کشنده‌ی اتانول یا غلظت غیر کشنده‌ی EDTA یا غلظت غیر کشنده‌ی اتانول و EDTA به صورت توأم تلقیح گردید. قبل از تلقیح به منظور تعیین تعداد اولیه‌ی باکتری‌های تلقیح شده، مایه‌ی تلقیح پس از رقیق‌سازی متوالی روی محیط TSA کشت گردید. محیط‌های TSB تلقیح شده به مدت یک ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد و سپس به منظور تعیین تعداد باکتری‌های زنده باقی‌مانده اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت بر روی محیط TSA گردید. کلیه‌ی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت (Zarei et al. 2013).

آنالیز آماری

نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری One-Way ANOVA و Independent Samples T-Test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در بخش اول تحقیق به منظور تعیین غلظت غیرکشنده اتانول و EDTA جهت افزودن به محیط کشت، تأثیر غلظت‌های مختلف این دو ترکیب بر باکتری مورد توجه قرار گرفت. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، تغییر چندانی در تعداد باکتری در حضور غلظت‌های ۲/۵ و ۵/۰ درصد اتانول مشاهده نمی‌گردد اما با افزایش غلظت اتانول به ۷/۵ و ۱۰ درصد کاهش محسوس و معنی‌داری در تعداد باکتری مشاهده می‌شود ($p<۰/۰۵$). به این جهت غلظت ۵ درصد اتانول در بخش دوم تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. در جدول ۲ نیز تأثیر غلظت‌های مختلف EDTA بر باکتری مورد ارزیابی قرار گرفته است. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تعداد باکتری در حضور غلظت‌های ۲/۵، ۵/۰ و ۷/۵ میلی‌مولار از این ترکیب تغییر چندانی را نشان نمی‌دهد اما با افزایش غلظت EDTA به ۱۰ میلی‌مولار کاهش محسوس و معنی‌داری در تعداد باکتری مشاهده می‌گردد ($p<۰/۰۵$). این روند نزولی تعداد باکتری با افزایش غلظت EDTA به ۱۵ و ۲۰ میلی‌مولار نیز ادامه می‌یابد. بدین جهت غلظت ۷/۵ میلی‌مولار EDTA در بخش دوم تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اتانول بر رشد و زنده‌مانی مرگانلا مرگانی در محیط TSB

غلظت اتانول در محیط (درصد)	تعداد باکتری تلقیح شده (لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی بر میلی‌لیتر)	تعداد باکتری پس از مدت زمان یک ساعت (لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی بر میلی‌لیتر)
۰	۶/۱۱±۰/۱۳	۶/۱۷±۰/۱۸
۲/۵	۶/۱۱±۰/۱۳	۶/۲۳±۰/۲۱
۵	۶/۱۱±۰/۱۳	۶/۰۳±۰/۱۷
۷/۵	۶/۱۱±۰/۱۳	۵/۲۸±۰/۱۴
۱۰	۶/۱۱±۰/۱۳	۴/۹۴±۰/۱۶

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

جدول ۲: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف EDTA بر رشد و زنده‌مانی مرگانلا مرگانی در محیط TSB

غلظت EDTA در محیط (میلی‌مولار)	تعداد باکتری تلقیح شده (لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی بر میلی‌لیتر)	تعداد باکتری پس از مدت زمان یک ساعت (لگاریتم واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی بر میلی‌لیتر)
۰	۶/۲۴±۰/۱۹	۶/۳۱±۰/۱۸
۲/۵	۶/۲۴±۰/۱۹	۶/۲۳±۰/۲۶
۵	۶/۲۴±۰/۱۹	۶/۲۹±۰/۱۱
۷/۵	۶/۲۴±۰/۱۹	۶/۱۹±۰/۱۳
۱۰	۶/۲۴±۰/۱۹	۵/۳۴±۰/۱۶
۱۵	۶/۲۴±۰/۱۹	۴/۴۶±۰/۳۴
۲۰	۶/۲۴±۰/۱۹	۳/۶۴±۰/۲۹

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

در بخش دوم تحقیق، تأثیر استفاده از غلظت‌های ۵ درصد اتانول و ۷/۵ میلی‌مولار EDTA به تنهایی و نیز استفاده‌ی توأم از این دو فاکتور در محیط کشت در افزایش حساسیت باکتری به شرایط اسیدی ایجاد شده توسط اسیدهای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. میزان زنده‌مانی باکتری با تقسیم تعداد سلول‌های زنده‌ی شمارش شده پس از مواجهه با شرایط اسیدی به تعداد باکتری‌های اولیه محاسبه گردید. همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد درصد زنده‌مانی باکتری در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک، در حضور اتانول و EDTA به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$)، اگر چه تفاوت معنی‌داری بین اتانول و EDTA از نظر میزان تأثیر بر کاهش زنده‌مانی وجود نداشت ($p>۰/۰۵$). از طرفی، استفاده‌ی توأم از اتانول و EDTA در محیط کشت، اثرات به مراتب قوی‌تری را نشان داد، به طوری که درصد زنده‌مانی باکتری در این حالت به طور معنی‌داری کمتر از حضور اتانول یا EDTA به تنهایی در محیط کشت بود ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین در مقایسه‌ی سلول‌های فاز لگاریتمی با سلول‌های فاز سکون رشد نیز می‌توان به حساسیت بالاتر سلول‌های فاز لگاریتمی نسبت به سلول‌های فاز سکون رشد پی برد. سلول‌های فاز لگاریتمی در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسیدکلریدریک درصد زنده‌مانی کم‌تری را در مقایسه با سلول‌های فاز سکون رشد نشان دادند اگر چه که این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. اما در حضور اتانول، EDTA و حضور توأم اتانول–EDTA، درصد زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی به طور معنی‌داری کم‌تر از سلول‌های فاز سکون بود ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳: تأثیر اتانول و EDTA بر میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد مرگانلا مرگانی در pH=۵ ایجاد شده توسط اسید کلریدریک

محیط کشت TSB با pH = ۵ حاوی	درصد زنده‌مانی	
	فاز لگاریتمی رشد	فاز سکون رشد
اسید کلریدریک (کنترل)	b,A۵۸/۱ ± ۸/۵	a,A۸۴/۵ ± ۱۰/۶
اسید کلریدریک و اتانول (۵ درصد)	b,B۱۸/۳ ± ۵/۲	a,B۳۹/۲ ± ۴/۵
اسید کلریدریک و EDTA (۷/۵ میلی مولار)	b,B۹/۲ ± ۴/۳	a,B۲۵/۵ ± ۷/۶
اسید کلریدریک و اتانول (۵ درصد) و EDTA (۷/۵ میلی مولار)	b,C۰/۵۱ ± ۰/۱۳	a,C۶/۶ ± ۱/۹

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

– اعداد مربوط به یک ردیف که حروف انگلیسی کوچک (a و b) غیرمشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد مربوط به یک ستون که حروف انگلیسی بزرگ (A و B و C) غیرمشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

هنگام استفاده از اسیدهای آلی نظیر اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید تارتاریک و اسید سیتریک به عنوان عامل اسیدی کننده‌ی محیط، نتایج تقریباً مشابهی با آن چه که در مورد اسید کلریدریک بیان گردید مشاهده شد. همان طور که در جداول ۴ الی ۷ مشاهده می‌گردد، درصد زنده‌مانی باکتری در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسیدهای آلی، در حضور اتانول یا EDTA کاهش یافت. هم‌چنین استفاده‌ی توأم از اتانول و EDTA در محیط کشت کاهش معنی‌داری را در درصد زنده‌مانی باکتری در مقایسه با حضور هر یک از این دو عامل به تنهایی در محیط کشت، نشان داد (p<۰/۰۵). سلول‌های فاز لگاریتمی در pH برابر با ۵ ایجاد شده توسط اسیدهای آلی نیز تقریباً در کلیه‌ی تیمارها درصد زنده‌مانی کم‌تری را در مقایسه با سلول‌های فاز سکون نشان دادند (p<۰/۰۵).

جدول ۴: تأثیر اتانول و EDTA بر میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد مرگانلا مرگانی در pH=۵ ایجاد شده توسط اسید استیک

محیط کشت TSB با pH = ۵ حاوی	درصد زنده‌مانی	
	فاز لگاریتمی رشد	فاز سکون رشد
اسید استیک (کنترل)	b,A۱۷/۴ ± ۳/۹	a,A۴۰/۴ ± ۷/۳
اسید استیک و اتانول (۵ درصد)	b,B۳/۶ ± ۱/۱	a,AB۲۷/۲ ± ۷/۹
اسید استیک و EDTA (۷/۵ میلی مولار)	b,B۰/۹۲ ± ۰/۴۱	a,B۱۷/۱ ± ۴/۴
اسید استیک و اتانول (۵ درصد) وEDTA (۷/۵ میلی‌مولار)	b,C۰/۰۴ ± ۰/۰۱	a,C۱/۳ ± ۰/۴۱

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

– اعداد مربوط به یک ردیف که حروف انگلیسی کوچک (a و b) غیرمشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

– اعداد مربوط به یک ستون که حروف انگلیسی بزرگ (A، B و C) غیرمشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

جدول ۵: تأثیر اتانول و EDTA بر میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد مرگانلا مرگانی در pH=۵ ایجاد شده توسط اسید لاکتیک

محیط کشت TSB با pH = ۵ حاوی	درصد زنده‌مانی	
	فاز لگاریتمی رشد	فاز سکون رشد
اسید لاکتیک (کنترل)	b,A۱۶/۳ ± ۴/۱	a,A۳۶/۹ ± ۶/۱
اسید لاکتیک و اتانول (۵ درصد)	b,B۳/۱ ± ۰/۹	a,B۱۳/۶ ± ۳/۹
اسید لاکتیک و EDTA (۷/۵ میلی مولار)	b,B۳/۴ ± ۱/۲	a,B۹/۱ ± ۴/۲
اسید لاکتیک و اتانول (۵ درصد) و EDTA (۷/۵ میلی‌مولار)	b,C۰/۰۹ ± ۰/۰۲	a,C۱/۳ ± ۰/۴

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

جدول ۶: تأثیر اتانول و EDTA بر میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد مرگانلا مرگانی در pH=۵ ایجاد شده توسط اسید تارتاریک

محیط کشت TSB با pH = ۵ حاوی	درصد زنده‌مانی	
	فاز لگاریتمی رشد	فاز سکون رشد
اسید تارتاریک (کنترل)	b,A۲۴/۶ ± ۴/۸	a,A۵۷/۱ ± ۹/۳
اسید تارتاریک و اتانول (۵ درصد)	b,B۱۱/۲ ± ۲/۸	a,B۱۸/۶ ± ۵/۸
اسید تارتاریک و EDTA (۷/۵ میلی‌مولار)	b,B۷/۶ ± ۱/۳	a,B۱۹/۴ ± ۷/۲
اسید تارتاریک و اتانول (۵ درصد) و EDTA (۷/۵ میلی‌مولار)	b,C۰/۰۷ ± ۰/۰۱	a,C۳/۱ ± ۱/۲

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

جدول ۷: تأثیر اتانول و EDTA بر میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد مرگانلا مرگانی در pH=۵ ایجاد شده توسط اسید سیتریک

محیط کشت TSB با pH = ۵ حاوی	درصد زنده‌مانی	
	فاز لگاریتمی رشد	فاز سکون رشد
اسید سیتریک (کنترل)	b,A۲۳/۱ ± ۷/۴	a,A۴۸/۸ ± ۷/۲
اسید سیتریک و اتانول (۵ درصد)	b,A۱۰/۱ ± ۴/۴	a,B۱۸/۱ ± ۴/۷
اسید سیتریک و EDTA (۷/۵ میلی‌مولار)	b,B۱/۹ ± ۰/۵	a,C۶/۴ ± ۱/۹
اسید سیتریک و اتانول (۵ درصد) و EDTA (۷/۵ میلی‌مولار)	b,C۰/۰۸ ± ۰/۰۲	a,D۱/۳ ± ۰/۴

- اعداد ارائه شده در جدول میانگین ± انحراف معیار سه تکرار مجزا می‌باشند.
- اعداد مربوط به یک ردیف که حروف انگلیسی کوچک (a و b) غیرمشابه دارند، دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.
- اعداد مربوط به یک ستون که حروف انگلیسی بزرگ (A، B، C و D) غیرمشابه دارند دارای تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) می‌باشند.

بحث

تأثیر فاز رشد بر پاسخ باکتری‌ها به استرس‌های محیطی از جمله استرس محیط اسیدی در تحقیقات مختلفی ثابت شده است (McMahon et al. 2000, Yeung and Boor 2004). Cotter و Hill در سال ۲۰۰۳ دریافتند که میزان زنده‌مانی *لیستریا مونوسایتوژنز* در شرایط اسیدی به فاز رشد این باکتری وابسته است به طوری که سلول‌های فاز سکون در pH=۳/۵ به مدت ۶۰ دقیقه زنده ماندند اما سلول‌های فاز لگاریتمی در شرایط مشابه به میزان ۲/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافتند. Chiang و Chou در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که سلول‌های فاز سکون *ویبریو پاراهمولیتیکوس*[1] مقاومت بیش‌تری را نسبت به اتانول و گرما در مقایسه با سلول‌های فاز لگاریتمی دارند. در مطالعه‌ی حاضر نیز سلول‌های فاز لگاریتمی *مرگانلا مرگانی* حساسیت بیش‌تری را نسبت به شرایط اسیدی در مقایسه با سلول‌های فاز سکون نشان دادند.

در مطالعه‌ی حاضر، میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* در حضور اسیدهای آلی کم‌تر از اسید کلریدریک بود. این مسأله ثابت شده است که 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. بر خلاف پروتون‌ها و سایر مولکول‌های باردار، مولکول‌های چربی‌دوست غیریونیزه‌ی اسیدهای آلی می‌توانند آزادانه از غشاء عبور کنند. اسیدهای آلی (ضعیف) به دلیل این که از pK_a بالاتری برخوردارند در محیط‌هایی با pH پایین، مقدار فرم غیریونیزه اسید زیاد بوده و این مولکول‌های تفکیک نشده‌ی اسید به راحتی وارد سلول باکتری می‌شوند. بنابراین اسیدهای آلی دارای اثرات ضدمیکروبی بیش‌تری در مقایسه با اسیدهای قوی مثل اسید کلریدریک می‌باشند.

[۲] بر اساس نتایج تحقیق حاضر، افزودن اتانول به محیط اسیدی شده با اسیدهای مختلف، در تمامی موارد باعث کاهش در میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی باکتری در مقایسه با گروه کنترل که فاقد اتانول بود، گردید. این کاهش به جز در یک مورد (اسید سیتریک) از لحاظ آماری معنی‌دار بود. در مورد سلول‌های فاز سکون نیز نتایج مشابهی به دست آمد به طوری که کاهش در میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز سکون باکتری در تمامی موارد به جز یک مورد (اسید استیک) از لحاظ آماری معنی‌دار بود. اتانول به عنوان یک ضدعفونی کننده از گذشته‌های دور در پزشکی مورد استفاده بوده است. اتانول در ایالات متحده آمریکا جزء افزودنی‌های ایمن غذایی (GRAS) می‌باشد. Jordan و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که استفاده توأم از کاهش pH و اتانول به طور مؤثری سبب مرگ باکتری *اشریشیا کلای* O157:H7 گردید. آن‌ها این اثرات مطلوب و مرگ *اشریشیا کلای* O157:H7 را به توانایی اتانول در تخریب دیواره‌ی سلول باکتری و در نتیجه ناتوان کردن باکتری در تنظیم pH داخلی خود مربوط دانستند. آن‌ها هم‌چنین بیان کردند که اثر اتانول وابسته به pH است و با افزایش pH کاهش می‌یابد. Barker و Park در سال ۲۰۰۱ بیان کردند که در غیاب اتانول کاهش زیادی در تعداد سلول‌های زنده *لیستریا مونوسیتوژنز* در pH برابر با ۳ و در طی مدت ۹۰ دقیقه رخ می‌دهد اما در حضور ۵ درصد اتانول این کاهش بسیار شدیدتر و سریع‌تر رخ می‌دهد. این محققین هم‌چنین نشان دادند که اثر اتانول در حساس کردن باکتری و کاهش میزان زنده‌مانی آن منحصر به شرایط اسیدی نیست بلکه این اثرات در شرایط هیپراسموتیک و

1- *Vibrio parahemolyticus*

هیپواسموتیک نیز مشاهده می‌شود. در این موارد نیز افزایش نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی باکتری به وسیله اتانول، عامل اختلال در توزیع مناسب یون‌ها در داخل سیتوپلاسم باکتری بوده و باعث افزایش میزان مرگ باکتری می‌شود.

در مطالعه‌ای که به وسیله‌ی Lou و Yousef در سال ۱۹۹۶ انجام شد، مشخص گردید که مواجهه‌ی *لیستریا مونوسیتوژنز* با غلظت ۵ درصد اتانول باعث ایجاد مقاومت به شرایط اسیدی در آن می‌شود. این نتایج با نتایج مطالعه‌ی حاضر و نیز مطالعه‌ی Barker و Park در سال ۲۰۰۱ مغایرت دارد. علت این مغایرت به روش انجام تحقیق مربوط است. در مطالعه‌ی Lou و Yousef در سال ۱۹۹۶ باکتری در ابتدا با اتانول مواجه شد و پس از آن در محیطی دیگر که عاری از اتانول بود با شرایط اسیدی مواجه گردید. حال آن که در تحقیق حاضر و هم‌چنین در تحقیق Barker و Park در سال ۲۰۰۱ باکتری مورد مطالعه به طور هم‌زمان با اتانول و شرایط اسیدی مواجه گردید.

تحقیق حاضر هم‌چنین نشان داد که EDTA نیز اثری مشابه اتانول در افزایش حساسیت سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون *مرگانلا مرگانی* نسبت به شرایط اسیدی دارد. در هنگام حضور EDTA در محیط، در مورد کلیه‌ی اسیدهای مورد آزمایش، تفاوت معنی‌داری بین گروه کنترل (فاقد EDTA) و گروه حاوی غلظت ۷/۵ میلی‌مولار EDTA مشاهده گردید. EDTA به عنوان یک ترکیب ضدمیکروب شناخته نمی‌شود، بلکه به عنوان یک تقویت‌کننده[1] اثر سایر مواد ضدمیکروبی شناخته می‌شود. این ترکیب با جذب کاتیون‌های دو ظرفیتی باعث آسیب به لایه‌ی لیپوپلی‌ساکاریدی و رها شدن تا ۴۰ درصد از لیپوپلی‌ساکارید دیواره‌ی باکتری‌های گرم منفی شده در نتیجه موجب افزایش نفوذپذیری دیواره‌ی سلولی آن‌ها می‌شود (Alakomi 2003, Lambert et al. 2004). بنابراین سایر مواد ضدمیکروبی به راحتی می‌توانند وارد سلول باکتری شوند و اثرات خود را بگذارند. از این رو به ترکیباتی نظیر EDTA، نفوذپذیرکننده[2] گویند. Lambert و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند که در صورت استفاده‌ی توأم از EDTA با مواد ضدمیکروبی نظیر ترکیبات چهارتایی آمونیوم[3]، اکساسیلین[4]، سفامندول[5] و آمپیسیلین[6]، حداقل غلظت مهارکننده‌ی[7] این ترکیبات بین ۳ تا ۷۰ برابر کاهش می‌یابد. در تحقیق حاضر میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون *مرگانلا مرگانی* در محیط حاوی اسید سیتریک و EDTA به طور معنی‌داری کم‌تر از محیط حاوی اسید سیتریک و اتانول بود. این یافته شاید به دلیل خاصیت جذب فلزات اسید سیتریک باشد که در استفاده‌ی توأم با EDTA تشدید شده و اثرات به مراتب قوی‌تری را ایجاد کرده است.

در هنگام استفاده‌ی توأم از اتانول و EDTA در محیط‌های اسیدی ایجاد شده در این تحقیق، میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز سکون و لگاریتمی باکتری به طور معنی‌داری کم‌تر از گروه کنترل (فاقد اتانول یا EDTA) و گروه‌های حاوی هر کدام از این دو فاکتور به تنهایی بود که این یافته قابل انتظار بود.

در مجموع یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که اتانول و EDTA، به تنهایی یا توأم، توانایی حساس کردن *مرگانلا مرگانی* به شرایط اسیدی را دارند. بنابراین با توجه به مقاومت اسیدی بالای این باکتری می‌توان جهت کنترل آن در مواد غذایی از ترکیب اسیدهای آلی و این ترکیبات استفاده کرد.

1- Potentiator
2- Permeabilizer
3- Quaternary ammonium compounds
4- Oxacillin
5- Cefamandole
6- Ampicillin
7- Minimum inhibitory concentration-MIC

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی از این تحقیق تشکر و قدردانی می‌گردد. هم‌چنین از زحمات سرکار خانم اصفهانی کارشناس محترم آزمایشگاه بهداشت و کنترل مواد غذایی نیز قدردانی می‌گردد.

منابع

Alakomi, H.L.; Saarela, M. and Helander, I.M. (2003). Effect of EDTA on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. Microbiology, 149: 2015–2021.

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 Diseases, 22(2): 372-373.

Barker, C. and Park, S.F. (2001). Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. Applied and Environmental Microbiology, 67 (4): 1594-1600.

Chiang, M.L. and Chou, C.C. (2009). Survival of *Vibrio parahaemolyticus* under environmental stresses as influenced by growth phase and pre-adaptation treatment. Food Microbiology, 26: 391–395.

Chiang, M.L., Ho, W.L. and Chou, C.C. (2008). Ethanol shock changes the fatty acid profile and survival behavior of *Vibrio parahaemolyticus* in various stress conditions. Food Microbiology, 25: 359–365.

Cotter, P.D. and Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. Microbiology And Molecular Biology, 3: 429-453.

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.

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.

Jordan, S.L.; Glover, J.; Malcom, L.; Thomson-Carter, F.M.; Booth, I.R. and Park, S.F. (1999). Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. Applied Environment Microbiology. 65: 1308–1311.

Lambert, R.J.W.; Hanlon, G.W. and Denyer, S.P. (2004). The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Microbiology, 96: 244–253.

Lou, Y. and Yousef, A.E. (1996). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. Applied and Environmental microbiology, 63(4):1252-1255.

Mastroianni, A.; Coronado, O. and Chiodo, F. (1994). *Morganella morganii* meningitis in a patient with AIDS. Journal of Infection, 29: 356-357.

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.

Muller, H.E. (1986). Occurrence and pathogenic role of *Morganella-Proteus-Providencia* group bacteria in human feces. Journal of Clinical Microbiology, 23(2): 404-405.

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.

Pomeranz, A.; Korzets, Z.; Eliakim, A.; Pomeranz, M.; Uziel, Y. and Wolach, B. (1997). Relapsing Henoch-Schonlein purpura associated with a tubo-ovarian abscess due to *Morganella morganii.* American Journal of Nephrology, 17: 471-473.

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

Verboon-Maciolek, M.; Vandertop, W.P.; Peters, A.C.B.; Roord, J.J. and Geelen, S.P.M. (1995). Neonatal brain abscess caused by *Morganella morgagni*. Clinical Infectious Disease, 20: 471.

Yeung, P.S. and Boor, K.J. (2004). Effects of acid stress on *Vibrio parahaemolyticus* survival and cytotoxicity. Journal of Food Protection, 67(7): 1328-1334.

Young, G.M., Amid, D. and Miller, VL. (1996). A bifunctional urease enhances survival of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Morganella morganii* at low pH. Journal of Bacteriology, 178: 6487–6495.

Zarei, M.; Maktabi, S.; Khezrzadeh, M. and Jamnejad, A. (2013). Susceptibility of *Morganella morgani*i to varioius environmental stresses after cold and heat shock treatments. Journal of Food Safety, 33: 107–113.

Evaluation of potential sensitization of *Morganella morganii* to acidic conditions by ethanol and EDTA

Zarei, M.[1]; Pourmahdi Borujeni, M.[1] and Jazayeri, S.A.[2]

Received: 19.06.2013 Accepted: 12.01.2014

Abstract

The ability of bacteria to tolerate low pH is a very important trait to survive in a variety of environments. *Morganella morganii*, the most prolific histamine former in fish and seafood products, has the ability to tolerate low pH and survive in acidic environments. In the present study, the ability of EDTA and ethanol to sensitize *M. morganii* to low pH and organic acids was assessed. To achieve this purpose, cells of *M. morgani* in exponential or stationary growth phases were exposed to pH=5, adjusted by adding hydrochloric, acetic, lactic, citric or tartaric acids into TSB, in the presence of 5 % ethanol and/or 7.5 mM EDTA, for one hour. Survival percentage was obtained by dividing the surviving population by the initial population. According to the results of the present study, 5 % ethanol made both the exponential and stationary phase cells of *M. morganii* more sensitive to acidic environments tested ($p<0.05$). The same results were observed for 7.5 mM EDTA. Combination of 5 % ethanol and 7.5 mM EDTA in acidic environments showed more pronounced effects on the acid tolerance of *M. morganii* ($p<0.05$), while in the presence of this combination the lowest survival percentages of exponential and stationary phase cells of the bacterium were observed. Thus, ethanol and EDTA, individually or combined, can enhance the rate of inactivation of *M. morganii* during exposure to low pH and organic acids. Furthermore, in the present study, exponential phase cells of *M. morganii* were more susceptible to acidic conditions than the stationary phase cells ($p<0.05$).

Key words: *Morganella morganii*, Ethanol, Acid tolerance, EDTA

1- Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2- DVM Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Corresponding Author: Zarei, M., E-mail: zarei@scu.ac.ir