

تعیین میزان pH مرز رشد و عدم رشد و مرز بقا و مرگ استافیلوکوکوس ارئوس با استفاده از اسیدهای آلی و معدنی در حرارت‌های مختلف نگهداری

دکتر ودود رضویبلر^۱ دکتر عبدالله جمشیدی^۲ دکتر بهار شمشادی^۳

Study of the minimum supporting and maximum inhibiting pH values of *Staphylococcus aureus* growth affected by the kind of acids and temperature of storage

Razavilar, V.,¹ Jamshidi, A.,² Shemshadi, B.³

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. ²Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Mashhad, Mashhad - Iran. ³Graduated from The Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

Objective: To compare the antimicrobial activity (The minimum supporting and maximum inhibiting pH values) of 3 organic (acetic, lactic, citric) and one inorganic (hydrochloric) acids against *S. aureus* growth.

Design: Experimental study, multiple factorial analysis using inoculation technic.

Procedure: The effects of pH (6 to 4 with 0.2 unit intervals) adjusted by three organic (acetic, lactic, citric) and one inorganic (Hydrochloric) acids, 3 levels of temperature (15, 25, 35 °C) started up to 14 days were evaluated on the growth of *S. aureus* with inoculum level of 10⁵/ml in Brain heart infusion broth (BHI) the pH border of growth and no growth was determined based on the turbidity of BHI after 14 days, and the pH border of survival and death of organism was determined using a subculture from no growth condition of BHI samples on Baird Parker agar plates at the end of 14 days incubation.

Results: The highest pH values of growth and no growth were observed in the case of acetic acid (5.2 and 5, 5.4 and 5.2, 5.8 and 5.6 at 35, 25 and 15 °C, respectively), where as, the lowest pH values belonged to hydrochloric acid (with <4 and 4 at 35 and 25 °C, and 5 and 5.2 at 15 °C). The bacteriostatic and bacteriocidal effects of acids were in the order of acetic > lactic > citric > hydrochloric. These effects decreased with increasing the temperature of storage in all of the acids used in this study. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran. 57, 2: 37-41, 2002.*

Key words: *S. aureus*, Temperature, pH, Hydrochloric, Citric, Lactic and Acetic acids, Growth response.

هدف: مقایسه خاصیت ضد میکروبی (pH مرز رشد و عدم رشد و مرز بقا و مرگ) سه اسید آلی (استیک، لاکتیک، سیتریک) و اسید معدنی (هیدروکلریک) در مقابل استافیلوکوکوس ارئوس.

طرح: مطالعه تجربی به شیوه تلقیحی و آنالیز چند فاکتوری.

روش: رفتار استافیلوکوکوس ارئوس از نظر رشد در pH های مختلف (۴ تا ۶) با اختلاف‌های ۰/۲ واحد) با استفاده از سه اسید آلی (استیک، لاکتیک، سیتریک) و یک اسید معدنی (هیدروکلریک) در محیط آنگوش (Brain Heart Infusion Broth) BHI، در حرارت‌های مختلف (۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتیگراد) به مدت ۱۴ روز جهت تعیین مرزهای رشد و عدم رشد و نیز مرزهای بقا و مرگ سلول باکتری مورد مطالعه آنالیز چند فاکتوری قرار گرفت. مرز رشد و عدم رشد بر اساس مشاهده کدورت در محیط‌های کشت (BHI) به عنوان نشانه رشد و شفافیت آن به عنوان عدم رشد باکتری و مرز بقا و مرگ سلول باکتری نیز بر اساس کشت سطحی از محیط‌های شفاف (بدون رشد) در محیط Baird Parker در پایان روز چهاردهم تعیین گردید.

نتایج: بالاترین pH حد مرز رشد و عدم رشد در مورد اسید استیک، به مقدار ۵ و ۵/۲، ۵/۲، ۵/۴، ۵/۶ و ۵/۸ به ترتیب در حرارت‌های ۱۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سانتیگراد مشاهده گردید. پایینترین pH حد مرز رشد و عدم رشد در مورد اسید هیدروکلریک در حرارت‌های ۳۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد برابر با ۴ و ۴ و در حرارت ۱۵ درجه سانتیگراد برابر با ۴/۸ و ۵ تعیین گردید. در این مطالعه قدرت باکتری اسیدی اسید استیک بیش از سایر اسیدها بود و پس از آن بیشترین خاصیت ضد باکتری اسیدهای آزمایش شده را به ترتیب اسیدهای لاکتیک، سیتریک و هیدروکلریک نشان دادند طوری که pH مرز بقا و مرگ سلول باکتری در استفاده از اسید استیک بین ۵ و ۵/۲ در حرارت‌های ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد تعیین گردیده و در حرارت ۳۵ درجه سانتیگراد، مقدار pH جلوگیری کننده از رشد pH مرگ باکتری هر دو برابر با ۵ تعیین گردید. کاهش درجه حرارت نگهداری در تمامی اسیدهای مورد استفاده باعث افزایش pH مرز رشد و عدم رشد و نیز بقا و مرگ سلول باکتری گردید.

نتیجه گیری: از یافته‌های حاصل از این بررسی می‌توان نتیجه گیری نمود که بالاترین خاصیت ضد میکروبی استافیلوکوکوس ارئوس در اسید استیک و پایینترین آن در اسید هیدروکلریک رخ می‌دهد. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، (۱۳۸۱)، دوره ۵۷، شماره ۲، ۴۱-۳۷.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوس ارئوس، حرارت، pH، اسیدهای هیدروکلریک، سیتریک، لاکتیک و استیک، پاسخ رشد.

غذا و تغییر در رفتار اجتماعی از جمله تغییر در عادات غذایی می‌باشد (۱۰).

گونه استافیلوکوکوس ارئوس که عامل ایجاد اغلب بیماری‌ها استافیلوکوکی می‌باشد، یک باکتری کوکسی شکل، گرم مثبت و کاتالاز مثبت است که هم دارای متابولیسم اکسیداتیو و هم متابولیسم تخمیری می‌باشد (۵، ۱۴، ۱۸).

رشد استافیلوکوکوس ارئوس در دامنه‌ای از pH بین ۹/۸ تا ۴ اتفاق می‌افتد و اپتیمم رشد، در pH برابر ۶ تا ۷ می‌باشد، و این در حالی است که رشد و تولید انتروتوکسین در pH های مختلف شدیداً تحت تأثیر سایر عوامل مانند نوع محیط، غلظت نمک، مقدار تلقیح و بخصوص اتمسفر رشد قرار می‌گیرد.

نتایج بررسی‌های مختلف نشان می‌دهد که در شرایط هوازی رشد و تولید انتروتوکسین در pH=۴ نیز صورت می‌گیرد، در حالی که در شرایط

اطمینان از سلامت غذا از نظر میکروبی و نیز اطمینان از مدت زمان نگهداری آن بستگی به کاهش آلودگی و نیز جلوگیری و یا محدود نمودن رشد و یا از بین بردن جمعیت میکروبی دارد (۱۰). در دهه اخیر علی‌رغم اعمال قوانین مربوط به سلامت غذا و نیز معرفی و کاربرد سیستم (Hazard Analysis and Critical Control Point) HACCP and موارد وقوع بیماری‌های منتقله از طریق غذا در جهان صنعتی افزایش یافته است و به نظر می‌رسد این افزایش ناشی از تغییر در روش‌های کشاورزی، تکنیک‌های پروسس غذا، تجارت بین‌المللی

(۱) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
(۲) گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد - ایران.

(۳) دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.



شده باکتری اضافه گردید، که با تعیین تعداد باکتری در واحد حجم به روش شمارش پلیت (Plate count) تعداد تقریبی آن در حدود $1/1 \times 10^7$ تعیین گردید. با قرار دادن این لوله در دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب (Absorbance) آن نیز در حدود ۰/۱ مشخص گردید و عدد به دست آمده جهت تعیین میزان تلقیح باکتری در محاسبات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

ب- تهیه محیط کشت و آزمایش باکتری: به عنوان سوبسترای پایه جهت رشد باکتری/استافیلوکوکوس/ارئوس از محیط مایع BHI استفاده گردید، که پس از آماده نمودن به حجم نیم لیتر طبق دستورالعمل سازنده آن (دیفکو) در داخل یک ارلن، pH آنرا با هر یک از اسیدهای نرمال مورد آزمایش (اسید استیک، اسید لاکتیک، اسید سیتریک، اسید هیدروکلریک) در حد بالاترین pH مورد نظر (pH=۶) تنظیم نموده و از آن به میزان ۹/۹ میلی لیتر به لوله آزمایش در پیچدار منتقل گردید. با افزودن اسید مورد آزمایش به سوبسترای باقیمانده، مقدار pH محیط به میزان ۰/۲ واحد تقلیل داده شد، سپس مقدار ۹/۹ میلی لیتر از آن به لوله در پیچدار منتقل گردید، عمل کاهش pH به مقادیر ۰/۲ واحد تا رسیدن به پایینترین حد pH مورد نظر (pH=۴) ادامه داده که در مجموع تعداد ۱۱ لوله حاوی محیط مایع BHI با pH به فواصل ۰/۲ تهیه گردید، تمامی لوله ها در درجه حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو گردید.

ج - تلقیح محیط کشت: به هر یک از لوله های حاوی ۹/۹ میلی لیتر محیط مایع BHI که pH آنها با اسیدهای مورد نظر تنظیم شده بود، به میزان ۰/۱ میلی لیتر از کووت حاوی 10^7 باکتری استافیلوکوکوس ارئوس اضافه گردید. به طوری که در خاتمه هر یک از لوله ها حاوی 10^5 باکتری در هر میلی لیتر محیط کشت بود. لوله های تلقیح شده را در درجه حرارت مورد نظر در هر مرحله (۱۵°C - ۲۵°C - ۳۵°C) به مدت ۱۴ روز قرار داده و همه روزه از نظر رشد (کدورت، قابل رؤیت) مورد مشاهده قرار گرفت و نتایج در تاریخ مورد نظر ثبت گردید. در روز چهاردهم از لوله هایی که فاقد رشد بودند (لوله های شفاف) پس از مخلوط نمودن کامل به میزان ۰/۱ میلی لیتر برداشت نموده و در پلیت حاوی بردپارکر آگار کشت سطحی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C گرمخانه گذاری و سپس شمارش گردید.

نتایج

نتایج حاصل از آزمایشات بررسی رفتار باکتری استافیلوکوکوس ارئوس از نظر تعیین مرزهای رشد و عدم رشد که در محیطهای طراحی شده در برات BHI (مقادیر pH ۴ تا ۶ با فواصل ۰/۲) با اسیدهای آلی (اسید استیک، اسید سیتریک، اسید لاکتیک) و اسید معدنی (اسید هیدروکلریک) در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نتایج مطالعه تعیین مقادیر مرز رشد و عدم رشد استافیلوکوکوس ارئوس با استفاده از اسیدهای آلی (استیک، لاکتیک، سیتریک) و اسید معدنی (هیدروکلریک) در حرارتهای مختلف نگهداری.

*T	اسید سیتریک			اسید لاکتیک			اسید استیک			اسید هیدروکلریک		
	G*	NG*	d*	G	NG	d	G	NG	d	G	NG	d
۲۵	۴/۴	۴/۲	۱۳	۴/۶	۴/۴	۹	۵/۲	۵	۳	۴	<۴	۴
۲۵	۴/۸	۴/۶	۷	۴/۸	۴/۶	۱۰	۵/۴	۵/۲	۳	۴	<۴	۷
۱۵	۵/۴	۵/۲	۹	۵/۶	۵/۴	۷	۵/۸	۵/۶	۷	۵	۴/۸	۵

(T درجه حرارت بر حسب سانتیگراد، d) روزی که با افزایش مدت زمان نگهداری پس از آن تغییری در نتایج به دست آمده مشاهده نگردید (آخرین حد رشد باکتری)، (G) پایینترین حد pH که در آن رشد باکتری مشاهده گردید، (NG) بالاترین حد pH که در آن رشد باکتری مشاهده نگردید.

بیهوازی این محدوده به ۴/۶ در مورد رشد و ۵/۳ در مورد تولید انتروتوکسین تغییر می یابد (۱۸، ۱۰). در تعمیم این نتایج به شرایط کلی باید دقت نمود و تاثیر عوامل مختلف دیگر را نیز در نظر گرفت، به عنوان مثال تفاوت حساسیت نسبت به pH در بین سویه های مختلف وجود دارد، به طوری که نتایج یکی از بررسیها نشان می دهد که سویه های کواگولاز منفی نسبت به pH و حرارت حساستر از سویه های کواگولاز مثبت می باشند (۱۳).

یکی از عوامل بسیار مهم در فرموله کردن سیستم نگهدارنده، انتخاب ماده اسیدی کننده می باشد. بسیاری از اسیدهای آلی به عنوان افزودنی به غذا (Food additives) مورد استفاده قرار می گیرند.

اسیدهای آلی که فعالیت ضد میکروبی دارند عبارت اند از: استیک (Acetic)، لاکتیک (Lactic)، پروپیونیک (Propionic)، سوربیک (Sorbic) و بنزوئیک (Benzoic). ولی اسیدهای سیتریک (Citric)، کاپریلیک (Caprylic)، مالیک (Malic)، فوماریک (Fumaric) و سایر اسیدهای آلی فعالیت ضد میکروبی اندکی داشته به عنوان طعم دهنده مورد استفاده قرار می گیرند. فعالیت اسیدهای آلی به میزان زیادی بستگی به pH محیط دارد، و فرم تجزیه نشده (Undissociated form) آن به صورت اولیه مسئول فعالیت ضد میکروبی اسید آلی می باشد (۱۲، ۵).

بنابراین در انتخاب اسید آلی جهت فعالیت ضد میکروبی آن در غذا باید به pH تولید شده توسط اسید و PK آن توجه نمود. استفاده از اسیدهای آلی در غذا به طور کلی محدود به غذاهایی می شود که pH آن پایینتر از ۵/۵ باشد، چون PK اغلب اسیدهای آلی در دامنه pH از ۳ تا ۵ می باشد (۵). خصوصیت آزادسازی یون نیدروژن (H⁺) در محیط، که در مورد اسیدهای آلی و اسیدهای معدنی مشترک می باشد، موجب اختلال در عمل غشای سلولی از طریق تغییر ساختمانی آنزیمها و نیز تغییر در نفوذپذیری غشای سلولی می گردد (۱۲).

امروزه مشخص نمودن شرایطی که رشد باکتری در آن غیر ممکن است از اهمیت ویژه ای در صنایع غذایی برخوردار است. مدلهای تهیه شده در این زمینه میزان اثر مجموع موانع رشد را اندازه گیری نموده و آن مدلی که در آن میزان رشد باکتری برابر صفر باشد، در تامین سلامت مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد (۹).

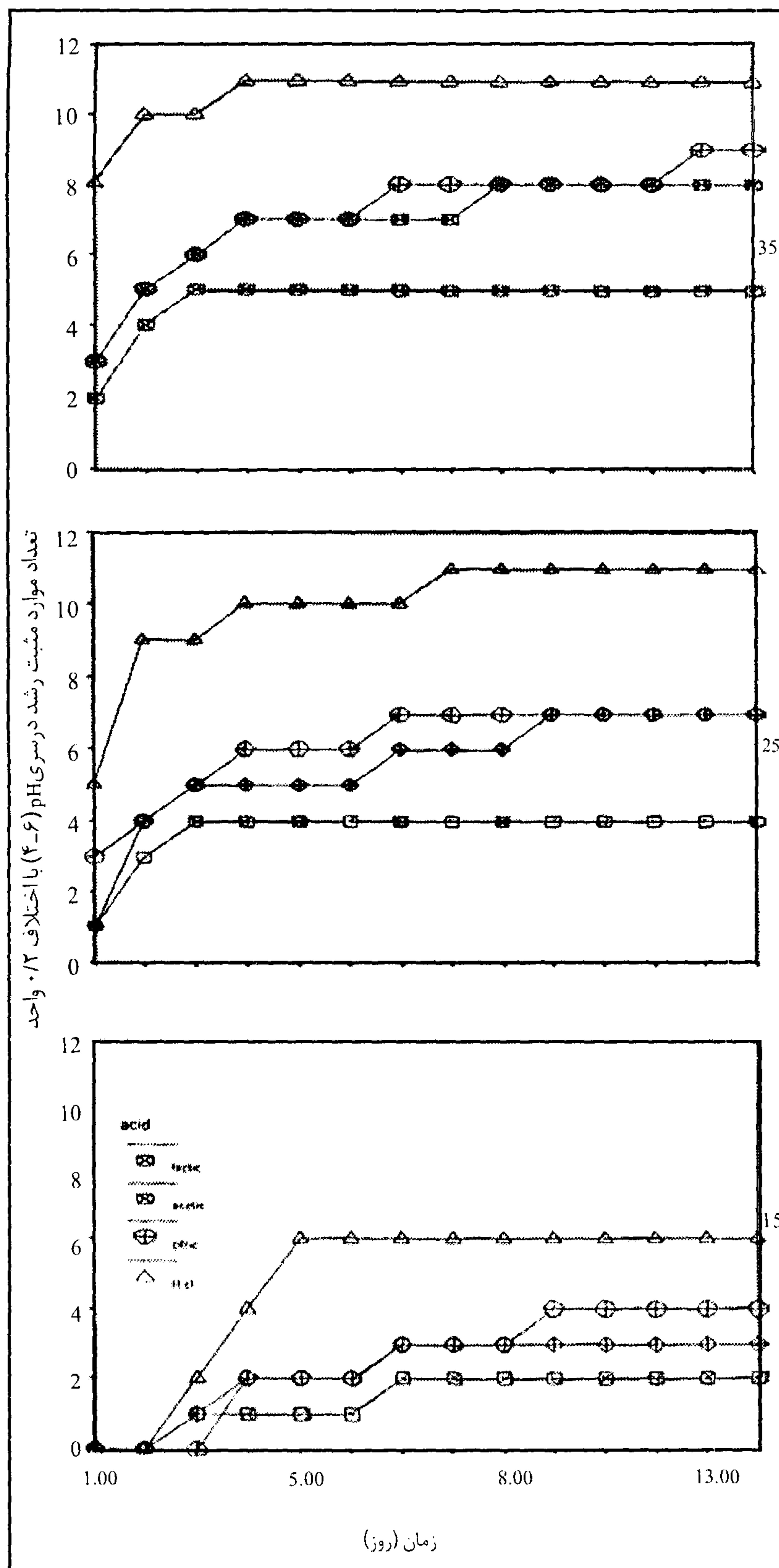
در این مطالعه با استفاده از سه اسید آلی (استیک، لاکتیک، سیتریک) و یک اسید معدنی (هیدروکلریک)، pH مرز رشد و عدم رشد و نیز مرز بقا و مرگ سلول باکتری استافیلوکوکوس تعیین گردید.

مواد و روش کار

الف - باکتری مورد آزمایش: استافیلوکوکوس ارئوس کواگولاز مثبت سویه ۹۶-۱۸ تهیه شده از مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی (RTCC) پس از انجام آزمایشات تأییدی، در محیط BHI آگار شیب دار کشت داده شد. سپس باکتری را از محیط BHI آگار برداشت نموده و دو کشت متوالی ۲۴ ساعته از آن در محیط مایع BHI در درجه حرارت ۳۷°C صورت گرفت و با انجام کشت و شمارش به روش کشت سطحی (Plate count) در محیط بردپارکر آگار تعداد تقریبی آن در هر میلی لیتر پس از سه بار تکرار برابر $1/2 \times 10^9$ برآورد گردید.

جهت تهیه کشت برای مطالعات تلقیحی در یک لوله کووت حاوی ۵ میلی لیتر آبگوشت BHI استریل، مقدار ۵۰/μl از سوسپانسیون شمارش





نمودار ۱- اثر مقادیر pH (۴-۶) تنظیم شده با اسیدهای مختلف در رشد استافیلوکوکوس آرنوس نگهداری شده در حرارت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتیگراد تا مدت ۱۴ روز.

مکانیسم‌های بقای باکتری حفظ می‌گردد (۹). قدرت ممانعت‌کنندگی از رشد همان‌طور که در جداول و نمودارها آمده است در مورد اسید استیک بیشتر از سایر اسیدها و پس از آن به ترتیب اسید لاکتیک و اسید سیتریک قرار دارد و قدرت ممانعت‌کنندگی اسید معدنی هیدروکلریک کمتر از سه اسید آلی مورد استفاده بود. این یافته با نتایج به دست آمده از سایر تحقیقات مطابقت دارد (۱۷، ۱۶، ۳، ۲). نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش درجه حرارت محیط pH، مرز رشد و عدم رشد و pH مرز بقاء و مرگ سلول باکتری کاهش می‌یابد. این یافته‌ها نیز با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت دارد (۸، ۷، ۶). بدین معنی که حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد در درجه حرارت‌های بالاتر افزایش می‌یابد (۳).

اسید استیک و اسید لاکتیک به علت اثر ضد میکروبی مناسب، به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ولی اسید سیتریک به علت فعالیت ضد میکروبی اندک بیشتر به عنوان طعم‌دهنده در غذاهای مختلف، مورد استفاده دارد (۵). طی بررسی‌های مختلف در مورد تأثیر ماده

نتایج به دست آمده نشان می‌دهد اثر ممانعت‌کنندگی از رشد باکتری به وسیله اسیدهای آلی و اسید معدنی مورد آزمایش به ترتیب عبارت است از اسید هیدروکلریک، اسید سیتریک، اسید لاکتیک و اسید استیک (اسید استیک با بالاترین اثر و اسید هیدروکلریک با کمترین اثر ممانعت‌کنندگی). نمودار ۱ نیز نشان‌دهنده اثر اسیدهای مختلف مورد بررسی با pH های از ۴ تا ۶ با اختلاف ۰/۲ واحد بر رشد استافیلوکوکوس آرنوس در درجه حرارت‌های (۱۵°C-۲۵°C-۳۵°C) می‌باشد. همچنین در این نمودار نشان داده شده است که با کاهش درجه حرارت نگهداری، رشد باکتری در pH های مختلف که با اسیدهای آلی و معدنی تنظیم گردیده بود نیز کاهش می‌یابد.

مرز بقاء و مرگ سلول باکتری در pH های مختلف در استفاده از سه اسید آلی و یک اسید معدنی در جدول ۲ آمده است که در مورد اسید سیتریک در درجه حرارت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتیگراد به ترتیب ۴-۴/۲، ۴/۴-۴/۶ و ۴/۸-۴/۶ بود.

این مرزها در حرارت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتیگراد برای اسید لاکتیک به ترتیب ۴/۲-۴/۴، ۴/۲-۴/۴ و ۴/۶-۴/۶ بود و در مورد اسید استیک مرز بقاء و مرگ سلول باکتری در pH بین ۵-۵/۲ در حرارت ۱۵ و ۲۵ درجه سانتیگراد تعیین گردید. در حالی که در ۳۵°C با استفاده از این اسید مقدار pH ممانعت‌کننده از رشد و pH مرگ باکتری هر دو برابر با ۵ تعیین گردید. در استفاده از اسید معدنی (اسید هیدروکلریک) در pH = ۴ و در حرارت‌های ۳۵°C و ۲۵°C تمامی لوله‌ها مثبت (کدر) شده بود (مرز رشد) و با توجه به این که در این pH (۴) لوله شفاف (مبین عدم رشد) جهت کشت سطحی و شمارش کلنی‌ها موجود نبود لذا pH مرز عدم رشد عملاً در این اسید به طور دقیق مشخص نگردید (pH < ۴). در حالی که pH مرز رشد و عدم رشد برای همین اسید در ۱۵°C برابر با ۴/۸ و ۵ تعیین گردید.

جدول ۲- تأثیر مقادیر pH (از ۴ تا ۶ با اختلاف ۰/۲ واحد) تنظیم شده با اسیدهای مختلف در مرز بقاء و مرگ استافیلوکوکوس آرنوس نگهداری شده در حرارت‌های ۱۵، ۲۵، ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۴ روز.

نوع اسید	۳۵°C		۲۵°C		۱۵°C	
	pH	کشت	pH	کشت	pH	کشت
اسید سیتریک	۴/۲	مثبت	۴/۴	مثبت	۴/۸	مثبت
	۴	منفی	۴/۲	منفی	۴/۶	منفی
اسید لاکتیک	۴/۴	مثبت	۴/۴	مثبت	۴/۶	مثبت
	۴/۲	منفی	۴/۲	منفی	۴/۴	منفی
اسید استیک	۵	منفی	۵/۲	مثبت	۵/۲	مثبت
			۵	منفی	۵	منفی
اسید هیدروکلریک					۴	مثبت
						تمامی لوله‌ها کدر (مثبت) شده بود
						تمامی لوله‌ها کدر (مثبت) شده بود

بحث

رشد باکتری‌های پاتوژن در غذا همواره موجب افزایش خطر بیماری‌های منتقله از طریق غذا می‌گردد. امروزه فراهم نمودن شرایطی که رشد باکتری دچار مشکل شده و یا دوره کمون رشد (lag phase) تا بی نهایت ادامه پیدا کند و به عبارت دیگر تعیین مرز رشد و عدم رشد، از اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی برخوردار است. مدل‌های تهیه شده در این زمینه میزان اثر مجموع موانع رشد را اندازه‌گیری نموده و آن شرایطی که طی آن میزان رشد باکتری برابر صفر می‌گردد را مشخص می‌نماید.

تعیین این نقطه از نظر فیزیولوژیک اهمیت دارد، چون در این نقطه روندهای بیوسنتر جهت حمایت از رشد باکتری کافی نیست، ولی



تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی و همکاری سرکار خانم نسرین طیار و سرکار خانم صفورا نوروزی کارشناسان آزمایشگاه کنترل بهداشتی مواد غذایی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Adams, M.R., and Moss, M.O. (1997): Food microbiology. The royal society of chemistry. Royal society of chemistry. Uk.
2. Admas, M. R., Little, C. L. and Easter, M. C. (1991): Modeling the effect of pH, acidulant and temperature on the growth rate of *Yersinia enterocolitica*. Journal. Appl. Bacteriol. 71: 66-71.
3. Brock Lehurst, T. F. and Lund, B. M. (1990): The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of *Yersinia enterocolitica*. Journal. Appl. Bacteriol. 69: 390-397.
4. Domenech, A., Hernandez, F. J., Orden, J. A., Goyache, J., Lopez, B., Suarez, G. and Gomez-Lucia, E. (1992): Effect of six organic acids on staphylococcal growth and enterotoxin production. Zlebenschm Unters Forch. 194: 124-128.
5. Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. J. (1999): Food Microbiology. Fundamentals and frontiers. ASM press. Washington, D. C.
6. Giannuzzi, L., Contreras, E., Zavitzky, N. (1999): Modeling the aerobic growth and decline of *Staphylococcus aureus* as affected by pH and potassium sorbate concentration Journal. Food prot. 62: 356-362.
7. Jay, J. M. (2000): Modern food microbiology. 6th ed. Chapman and Hall, New York.
8. Lee, R. M., Hartman, P. A., Olson, D. G., Williams, F. D. (1994): Metal ions reverse the inhibitory effects of selected food - grade phosphates in *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Protection. 57: 284-288.
9. Mc Meekin, T. A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumyer, K., Nichols, D. S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D. A., Ross, T., Salter, M. and Sontranan, S. (1998): Quantitative microbiology: A basis for food safety. Suggested citation (pub med).
10. Michael, P. (1989): Doyle. Food borne Bacterial Pathogens. Marcel Deer, INC. New York.
11. Mychas, G. J., Tranter, H. S., Brehm, R. D., Broad, R. G. (1991): *Staphylococcus aureus* S-6: Factors affecting its growth, Bacteriol. 70: 344-345.
12. Naidu, A. S. (2000): Natural Food Antimicrobial Systems, CRC press LLC. Washington, DC.
13. Salamah, A. A. (1990): Effect of heat and pH stresses on the recovery of *Staphylococcus aureus* on medium - 110. Microbiologica. 13: 274-252.
14. Salyers, A. A. and Whitt, D. D. (1994): Bacterial pathogenesis. A molecular approach. ASM Press. Washington, D. C.

اسیدی کننده بر رشد باکتریهای پاتوژن غذایی نشان داده شده است که در درجه حرارت‌های مختلف و در انواع غذاها، بخصوص تاثیر آن بر رشد باکتری استافیلوکوکوس ارئوس به ترتیب قدرت اثر ممانعت کننده عبارت اند از: اسید سولفوریک > اسید سیتریک > اسید لاکتیک > اسید پروپیونیک > اسید استیک (۱۷، ۱۶، ۳، ۲). نتایج فوق مشابه نتایج به دست آمده در این مطالعه می باشد. البته تفاوت نسبت به مقاومت در برابر انواع اسیدهای آلی در سویه های مختلف استافیلوکوکوس ارئوس گزارش گردیده است (۴). نتایج تحقیقات دیگر نشان می دهد که اثر ممانعت کنندگی گلوکز در محیط، بر رشد استافیلوکوکوس ارئوس نیز ناشی از تولید اسید لاکتیک و اسید استیک طی فرآیند تخمیر می باشد (۱۱، ۱۵).

اسیدهای معدنی از جمله اسید هیدروکلریک، یک اسید قوی بوده و در محیط به طور کامل تجزیه می شود، ولی اسیدهای آلی جزء اسیدهای ضعیف بوده و تجزیه شدن آنها در محیط بستگی به pH محیط دارد. به طور کلی اسیدهای آلی ضعیف در pH یکسان اثر مهار کنندگی بیشتر بر روی رشد میکروارگانیسمها نسبت به اسیدهای معدنی دارند که این خصوصیت به دلیل بالا بودن میزان PK_a و به عبارت دیگر مربوط به غلظت اسید تجزیه شده می باشد (۱، ۱۲).

مکانیسم عمل اسیدهای آلی و استرهای آن تا حدودی مشترک می باشد. فرم تجزیه نشده اسید به راحتی قادر به عبور از غشای سلولی بوده و داخل سلول به دلیل بالاتر بودن pH تجزیه می گردد. در این بررسی اثر ممانعت کنندگی اسید استیک بر رشد باکتری استافیلوکوکوس ارئوس بیشتر از اسید لاکتیک، اسید سیتریک و اسید هیدروکلریک بود، که علت آن PK_a بالاتر و به عبارت دیگر غلظت بالاتر فرم تجزیه نشده اسید استیک می باشد. به طور کلی باکتری pH داخلی را به دلیل محافظت از ساختمان پروتئینها، آنزیمها و اسیدهای نوکلئیک و فسفر لیپیدها در حد خنثی نگه می دارد. چون یون های تی دروژن (پروتونها) ناشی از جدا شدن اسیدهای آلی موجب اسیدی شدن سیتوپلاسم می گردند. می بایست به خارج سلول هدایت گردند (۷، ۵). که این امر مستلزم صرف انرژی به صورت ATP می باشد، که ادامه این روند منجر به تخلیه انرژی سلولی می گردد (۱۲، ۵). هر چه pH محیط پایینتر باشد غلظت اسید تجزیه نشده در حد بالاتری می باشد و این امر موجب فشار بیشتر بر سلول میکروارگانیسم ها می گردد. تا جایی که رشد آنرا متوقف نموده و منجر به مرگ آن می گردد (۱، ۱۲).

همچنین این نظریه وجود دارد که زنجیرهای کوتاه اسیدهای آلی، با دگرگون ساختن غشای سیتوپلاسمی، از طریق واکنش با پروتئینهای غشای در متابولیسم انرژی اختلال ایجاد می نمایند، این اختلال منجر به کاهش ATP از طریق اختلال در سیستم انتقال الکترون و یا ممانعت از انتقال فعال مواد غذایی به داخل سلول می گردد (۵).

به طور کلی نتایج این مطالعه نشان می دهد که هر چه درجه حرارت نگهداری پایینتر بوده و نیز از اسید آلی با PK_a بالاتر به عنوان محافظت کننده استفاده گردد اثر ممانعت کنندگی از رشد بیشتر بوده و در نتیجه مدت زمان نگهداری یک محصول غذایی طولانیتر می گردد. ولی در عمل باتوجه به ملاحظات ذائقه ای و خصوصیات ارگانولپتیک و نیز خصوصیات تغذیه ای محصول غذایی جهت فراهم نمودن سطح مطلوبی از ماندگاری یک ماده غذایی، باید ترکیبی از شرایط ممانعت کننده مورد استفاده قرار گیرد.



15. Smit, J. L. and Palumbo, S. A. (1978): Injury to *Staphylococcus aureus* during sausage fermentation. *Appl. Environ Microbiol.* 36: 857-860.
16. Smittle, R. B. (2000): Microbiological safety of mayonnaise, salad dressings, and sauces produced in the united states: a review. *Journal. Food Prot.* 63: 1144-1153.
17. Taniguchi, M., Nakazawa, H., Takeda, D., Kameko, T., Hoshino, K. and Tanaka, T. (1999): Production of mixture of antimicrobial organic acids from lactose by co culture of *Bifidobacterium longum* and *propini bacterium freudenreichii*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry.* 62: 1522-1527.
18. Varnam, A. H., and Evans, M. G. (1991): *Foodborne pathogens.* Wolf, London.

