# بررسی اثر pH و غلظت نمک به صورت منفرد و توأم بر رشد گونه های بروسلا با استفاده از روش پلیت گرادیان

**دکتر حمید عبداللهی**: استادیار گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان: نویسنده رابط
**رؤیا احمدرجبی**: مربی میکروب شناسی دانشکده پرستاری بم، دانشگاه علوم پزشکی کرمان
**دکتر سید محمدرضا احمدی موسوی**: متخصص گوش، حلق و بینی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

**دریافت: ۸۲/۲/۳۱ ، بازنگری: ۸۲/۹/۸ ، پذیرش: ۸۲/۹/۱۲**

## چکیده

**زمینه و اهداف:** بروسلا ها از جمله مهمترین باکتری های بیماریزای انسانی و حیوانی به شمار می روند که عمدتاً از طریق فرآورده های لبنی آلوده به انسان منتقل می شوند. از این رو، بهداشت مواد غذایی نقش مهمی در کنترل بروسلوز ایفا می‌کند. در کشور ما پنیر که هنوز در بسیاری از مناطق به صورت سنتی تهیه می شود، یکی از عمده ترین منابع آلودگی است. استفاده از نمک و اسید برای نگهداری بعضی از مواد غذایی از جمله پنیر سابقه دیرینه دارد ولی میزان اثر این عوامل علی الخصوص به صورت توأم تاکنون بر روی بروسلاها ارزیابی نشده اما مطالعات مشابهی با استفاده از روش پلیت گرادیان برروی سایر باکتری ها صورت پذیرفته که نتایج جالبی در بر داشته است. لذا بر آن شدیم که در این پژوهش اثر عوامل فوق را به صورت منفرد و توأم برروی گونه های مختلف بروسلا ارزیابی و مقایسه کنیم.

**روش بررسی:** در این مطالعه با استفاده از روش پلیت گرادیان یک و دوبعدی حاوی محیط کشت مناسب اثرات pHوغلظت نمک را به صورت منفرد و توأم بر روی رشد بروسلا آبورتوس ( سویه های ۵۴۴ و۱۹ S. ) وبروسلا ملیتنسیس (سویه های۱۶ M و Rev۱) و بروسلا سوییس (سویه ۱۳۳۰) که از مؤسسه رازی حصارک تهیه شده بودند، مورد ارزیابی قراردادیم. با نمونه برداری توسط چوب پنبه سوراخ کن استریل، جذب هر نمونه در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه گیری گردید. اطلاعات به دست آمده به وسیله برنامه رایانه ای Corel Chart به صورت سه بعدی ترسیم شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

**یافته ها:** میزان رشد هر باکتری در قسمتهای مختلف پلیت های گرادیان یک بعدی pH یا یک بعدی نمک طعام با باکتری دیگر و حتی بین دو سویه از یک گونه تا حدودی متفاوت بود. در پلیت های گرادیان دو بعدیpH-NaCl محدوده و میزان رشد در قسمتهای مختلف پلیت بیانگر افزایش شدت اثر بازدارندگی توأمان pH پایین و نمک طعام بالا بر روی رشد هر باکتری در مقایسه با وضعیتی بود که هر یک از این عوامل به تنهایی حضور داشتند. میزان رشد باکتری ها در شرایط حضور دو عامل pH پایین و نمک طعام بالا به صورت توأم، کاهش چشمگیری نسبت به وضعیت مورد انتظار تئوریک (حالت تجمعی: بدون در نظر گرفتن اثرات سینرژیستی و آنتاگونیستی بین دو عامل مربوطه) نشان می دهد، که این کاهش بین ۶۳٪ تا ۹۵٪ بود.

**نتیجه گیری:** شدت اثر دو عامل فوق به صورت توأم تا بیست برابر بیشتر از اثری است که هر عامل به تنهایی اعمال می کند ($p<۰/۰۰۱$) در بین باکتری های مورد آزمایش *بروسلا ملیتنسیس* سویهRev۱ و *بروسلا سوییس* سویه ۱۳۳۰ به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر پذیری را نسبت به دو عامل فوق نشان دادند.

**کلید واژه ها:** بروسلا، پلیت گرادیان، نمک طعام، pH

## مقدمه

بیماری بروسلوز یاتب مالت یکی از مشکلات عمده بهداشتی کشور ما محسوب می شود. این بیماری درانسان به خصوص در کشورهای در حال توسعه شیوع بالایی دارد و سالیانه حدود۵۰۰۰۰۰ مورد تازه بروسلوز از صد کشور جهان به سازمان بهداشت جهانی (W.H.O) گزارش می شود (۴-۱). شیوع نسبتاً بالای این بیماری تا حدودی می تواند مربوط به مقاومت نسبی بروسلا به عوامل محیطی باشد (۵). روش تشخیصی بروسلوز عمدتاً بر اساس یافتن باکتری بروسلا در نمونه هاست که اغلب به طریقه کشت صورت می پذیرد. برای این منظور باید دقیقاً نیازهای غذایی باکتری و عوامل محیطی مؤثر بر روی رشد باکتری را مد نظر داشت، چرا که رشد مطلوب باکتری فقط در حضور تمامی مواد و شرایط مورد نیاز برای بیوسنتز امکان پذیر است. مقادیر مناسب عوامل فیزیکوشیمیایی مثل حرارت، pH، فشار و رطوبت که بر فعالیت میکروارگانیسم ها اثر می گذارند، ممکن است حتی در سطح یک گونه نیزمنحصربه فرد باشد(۳، ۶و ۷).

شناسایی عوامل و تعیین میزان اثر آنها بر رشد و فعالیت باکتری ها می تواند در زمینه کنترل و بهداشت مواد غذایی به کار گرفته شود، زیراچنانچه یک یا تعدادی از این عوامل در سطح بازدارنده باشند می‌توانند مانع رشد میکروب ها شوند. گاهی احتمال داردکه ترکیب عوامل بازدارنده به صورت سینرژیستیکی عمل کنند و اثرات یکدیگر را تشدید نمایند. از این رو، چنین تصور می شود که استفاده از چند عامل بازدارنده به منظور نگهداری مواد غذایی یا احیاناً میکروب زدایی محیط های مختلف در مقایسه با کاربرد یک عامل به تنهایی موفقیت آمیزتر باشد (۸).

یکی از روشهای جالب برای بررسی اثر متغیرهای چند تایی استفاده از پلیت گرادیان دو بعدی است. پلیت گرادیان دو بعدی روش ساده و راحتی است که برای بررسی اثرات همزمان متغیرهای محیطی بر روی رشد باکتری های یک گونه یا گروهی از گونه های متعلق به یک جنس باکتریایی یا روی رقابت میان گونه های باکتریایی مختلف استفاده شده است (۱۳-۹ ). دراین روش غلظت محلولها بین دو محدوده (حداقل و حداکثر) قرارمی گیرد، وهر غلظت از یک عامل در مقابل همه غلظت های عامل دوم سنجیده می شود (۱۲). ازاین روش برای بررسی اثرگرادیان های متقابلpH و نمک طعام روی رشد باکتری های فتوسنتز کننده ارغوانی غیر سولفوره (۸) و باکتریهای نور افشان (۱۰) همچنین اثر گرادیان های متقابل کلرور سدیم و نیتریت سدیم روی*E. coli* (۱۰ و۱۲) و اثر pH وغلظت نمک ، درجه حرارت ونیتریت سدیم روی رشد سویه هایی از *سراشیا مارسه سنس*(۱۳)و برای تشخیص *لیستریا مونوسیتوژنز* استفاده شده است (۸ ).

از آنجا که غلظت نمک و pH جزء مهمترین متغیرهای محیطی محسوب می شوند که قادر به تمایز میان گونه های مختلف هستند (۱۲) و چون اطلاعات کمی در مورد اثرpH های مختلف روی گونه های جنس بروسلا وجود دارد (۲ ) برآن شدیم تا با استفاده از روش پلیت گرادیان دوبعدی اثر غلظت نمک وpH را روی تعدادی سویه از گونه های مختلف جنس بروسلا مورد بررسی قرار دهیم تا شاید بتوان گامی مؤثر در جهت شناخت بهتر عوامل مؤثر در رشد باکتری و نگهداری مواد غذایی برداشت.

## مواد و روش ها

### باکتریها و نگهداری آنها

باکتری های مورد آزمایش شامل *بروسلا آبورتوس* سویه های۵۴۴ و۱۹.S ، *بروسلا ملیتنسیس* سویه های ۱٦M و۱Rev و *بروسلا سوییس* سویه ۱۳۳۰ بودندکه به صورت لیوفیلیزه از مؤسسه رازی حصارک تهیه شدند.

صحت تشخیص اولیه آزمایشگاهی و خالص بودن باکتری های فوق توسط آزمون های تولید هیدروژن سولفوره ، فعالیت اوره آز، نیاز و عدم نیازبه $CO_2$، رشد در حضور رنگها ( فوشین بازی و تیونین)، اکسیداز، کاتالاز بررسی و پس از تأیید(۱٤و ۱۵)با رعایت اصول ایمنی (۱٦) در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.کلیه سویه های فوق بجز *بروسلا ملیتنسیس* Rev۱ بر روی محیط T.S.A[1] در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت کشت و سپس در یخچال تا مرحله کشت مجدد که هر شش هفته یکبار انجام می‌شد نگهداری می شدند. برای نگهداری *بروسلا* ملیتنسیسRev۱ از محیط آگار خونی تحت شرایط فوق استفاده شد.

### طرز ساخت محیط های کشت

**پلیت های گرادیان دو بعدی pH-NaCl** : از پلیت های یکبار مصرف چهار گوش[2] دارای ابعاد ۱۰×۱۰ سانتیمتر استفاده شد. طبق مراحل زیر پلیت ها آماده می شدند.

۱)پلیت به صورت شیبدار( یک ضلع با قرار گرفتن میله ای فلزی به ضخامت ۳ میلیمتر زیر آن مرتفع شد ) قرار داده شد و۱۵ میلی لیتر محیط کشت BHIYEGA[3] که با افزودن ۰/۵۸ سی سی اسید کلریدریک ۵نرمال اسیدی شده بود، درون پلیت ریخته شدو فرصت بستن آگار داده شد.

۲)پلیت روی سطح هموار تراز شده ای قرارگرفت و ۱۵ میلی لیتر محیط کشت که حاوی ۰/۵۸سی سی سود یک نرمال بود، درون آن ریخته شد تا سطح یکنواختی به دست آمد.

۳) بعد از بستن آگار لایه دوم، پلیت را ۹۰ درجه چرخانده و از یک طرف (عمود بر جهت قبل) دوباره پلیت به صورت شیب دار با همان ارتفاع قرار گرفت و ۱۵ میلی لیتر محیط کشت که حاوی۲/۵ w/v٪ کلرور سدیم (استثنائاً برای کشت *بروسلاسوییس* محیط حاوی٤/۷w/v٪ کلرور سدیم) بود درون پلیت ریخته شد.

٤)پس از بستن آگار لایه سوم، پلیت روی سطح هموار ترازشده ای قرار گرفت و ۱۵ میلی لیتراز محیط کشت فوق(بدون نمک طعام ) داخل آن ریخته شد تا سطح یکنواختی به دست آمد. این روش بر اساس دستورالعمل توماس و همکاران پیاده شد(۸).

### پلیت های گرادیان یک بعدی pH :

به منظور ساخت این نوع گرادیان مراحل اول و دوم فوق تکرار شد سپس برای تشکیل آخرین لایه ۳۰ میلی لیتر محیط کشت BHIYEGA درون پلیت ریخته شد(۸و ۱۰). در پلیت های مورد استفاده برای کشت بروسلا سوییس به منظور تشکیل غلظت نمک ثابت ۰/۹۳ ٪ این لایه علاوه بر نمک موجود در محیط کشت اولیه حاوی ۰/٤٦ w/v٪ نمک افزوده وبقیه پلیت ها برای تشکیل غلظت نمک ۰/٦۹٪،مقدار**۰/۲۲w/v**٪ نمک اضافی افزوده شد.

### پلیت های گرادیان یک بعدی NaCl

پلیت روی سطح هموار تراز شده ای قرار داده شد و ۳۰ میلی لیتر محیط کشت BHIYEGA داخل آن ریخته شد، سپس پلیت از یک طرف به صورت شیبدار قرار داده شد و مراحل سوم و چهارم فوق تکرار گردید. همچنین پلیت کنترل برای هر باکتری ( کنترل مثبت) حاوی ٦۰ میلی لیتر از محیط کشت BHIYEGA بدون اسید و باز و نمک اضافه شده ای بود(۸).

پلیت های گرادیان یک و دو بعدی همراه با پلیت کنترل به مدت ۲٤ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا تبادل یونی صورت پذیرد وحالت گرادیان غلظتی در سطح پلیت ایجاد کند.

### اندازه گیری گرادیان pH و نمک

در یک سری از پلیت های گرادیان بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون و بدون حضور باکتری، گرید فلزی $10\times10cm^2$ در داخل پلیت های گرادیان فرو برده شد که آگار را به یک آرایش ۱۰×۱۰ تقسیم می کرد. ازفواصل یک سانتیمتری ( مراکز مربعهای کوچک ) در سرتاسرپلیت با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن با قطر۵ میلیمتری یک پانچ برداشته می شد و هر پانچ در ۱۰سی سی آب دیونیزه به آرامی ذوب وpH آن توسط pHمتر مدل Copenhagen ، Radiometer (۱۷) اندازه گیری و ثبت شد. غلظت نمک در هر نمونه به روش هدایت الکتریکی توسط دستگاه Conductivity meter مدل Ollmann and COR G636 Friedberg Hessen ساخت آلمان، اندازه گیری شد (۸ ) و برای این منظور از منحنی کالیبراسیون (هدایت الکتریکی بر مولاریته ) استفاده گردید.

1. Tryptone soy agar
2. Bibby Sterilin Ltd.,Tilling Drive Stone,Staffordshire, ST15 OSA,U.K
3. Brain Heart Infusion Yeast Extract Glucose Agar

**تلقیح پلیت ها**

۲ سی سی از سوسپانسیون باکتری که با محلول ۰/۵ مک فارلند استاندارد شده بود در سطح هر محیط کشت تلقیح شده و با glass spreader در تمام سطح پلیت پخش شد و بعد از چند ثانیه ، پلیت به مدت یک دقیقه مورب نگه داشته و مایع اضافی از کناره پلیت بیرون ریخته شد (۸ و ۱۲).

پلیت ها به مدت ۹۶ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار داده شدند. سویه های جنس *بروسلا آبورتوس* در شرایط اتمسفریک دارای ۱۰٪ دی اکسید کربن قرار داده شدند .

بعد از رشد باکتری گرید فلزی در داخل پلیت قرار داده شد و از هر مربع صفحه مشبک که ناحیه رشد را در بر می گرفت دو پانچ در دو مرحله توسط چوب پنبه سوراخ کن استریل با قطر ۵ میلیمتر برداشته و هر یک پس از هموژنیزه کردن، در ۵۰ درجه سانتیگراد به حجم یک سی‌سی رسانده و با دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل Baush and Lomb 70 درطوج موج ۵۵۰ نانومتر میزان جذب نور اندازه‌گیری شد. سپس میانگین دو نمونه محاسبه گردید .در این مرحله از محیط کشت فاقد رشد به عنوان کنترل منفی[1] استفاده شد.

با استفاده از برنامه نرم افزاری Corel Chart اطلاعات گرد آوری شده به صورت نمودارهای سه بعدی تهیه شد. ضمناً با استفاده از برنامه EpiInfo6 وضعیت رشد واقعی در پلیت های گرادیان دو بعدی با حالت تئوریک (بدون در نظر گرفتن اثرات سینرژیستی دو عامل) مقایسه شد.

## یافته ها

مقادیر اندازه گیری شدهpH در پلیت گرادیان یک بعدی pH و دو بعدیpH-NaCl در جهت گرادیان در محدوده ۷/۱ تا ۳/۳ قرار داشت.

مقادیر اندازه گیری شده نمک در پلیت گرادیان یک بعدی NaCl و دو بعدیpH-NaCl از محلول ۲/۵w/v٪ کلرور سدیم بعد از گذشت ۲٤ ساعت در محدوده ۰/۶۹٪ تا ۲٪ و در پلیت های حاصل از محلول ٤/۷w/v٪ کلرور سدیم در محدوده ۰/۹۳٪تا ۲/۶۹٪ قرار داشت .

نتایج اثر غلظت های یون هیدروژن و نمک طعام به طور منفرد وتوأم بر روی ۵ سویه جنس بروسلا بعد از دو بار آزمایش(duplicate)در *جدول ۱* ارایه شده است .

حداکثر میزان رشد *بروسلا ملیتنسیس* سویه ۱۶M وسویه های *بروسلا آبورتوس* در پلیت گرادیان با غلظت نمک ثابت ۰/۶۹٪ در قسمتی که pH محیط نزدیک به خنثی است( ۷/۱) و بروسلا ملیتنسیس Rev۱ در همین غلظت نمک در pH=۶/۶ مشاهده شد. در مورد *بروسلا سوئیس* بیشترین میزان رشد در پلیت گرادیان با غلظت نمک ثابت ۰/۹۳٪ در pH= ۵/٤ مشاهده شد.

در پلیت های گرادیان یک بعدیNaCl ، حداکثر میزان رشد باکتری های مورد آزمایش بجز *بروسلا سوییس* در pH مشخص ۷/۱ و غلظت نمک ۰/۶۹٪ و۰/۷۲٪ مشاهده گردید. حداکثر میزان رشد *بروسلا سوییس*، در کمترین غلظت نمک موجود در پلیت گرادیان (۰/۹۳٪ )و pH ثابت ۷/۱ مشاهده شد.

گرچه مقادیرpH یا غلظت نمک بازدارنده از رشد در هر دو حالت (گرادیان یک بعدی و دو بعدی) بعضاً برای چند باکتری مورد آزمایش مشابه بود، اما میزان کاهش رشد در قسمتهای مختلف پلیت گرادیان دو بعدی بیانگر افزایش شدت اثر بازدارندگیpH و نمک طعام بر روی رشد هر باکتری در مقایسه با وضعیتی بود که هر یک از این عوامل به تنهایی حضور داشته اند .

بیشترین میزان رشد در پلیت های گرادیان دوبعدی برای *بروسلا آبورتوس* سویه ۵۴۴ غلظت نمک ۰/۸۳٪ و pH=۷/۱ و برای *بروسلا آبورتوس* سویه S.۱۹ غلظت نمک ۰/۶۹٪ و pH= ۶/۶ ، *بروسلا ملیتنسیس* ۱۶M غلظت نمک ۰/۸۳٪ و pH =۶/۲ ، *بروسلا ملیتنسیس* سویه Rev۱ غلظت نمک ۰/۸۳ ٪ و pH= ۷/۱ و برای *بروسلا سوییس* ۱۳۳۰ غلظت نمک ۰/۹۳ ٪ و pH=۶/۲ است.

اطلاعات مربوط به عوامل متغییر مستقل ( پلیت یک بعدیpH یا نمک ) را به طور همزمان در یک نمودار رسم و انتظار وضعیت رشد یا عدم رشد تئوریک برای هر باکتری را مشخص کردیم؛ به عنوان مثال، میزان رشد باکتری *بروسلا ملیتنسیس* سویهRev۱ در پلیت گرادیان یک بعدیpH و یک بعدی NaCl و همچنین میزان رشد مورد انتظار و واقعی در پلیت گرادیان دو بعدی pH-NaCl آن در *نمودار ۱* ( الف تا ج ) آورده شده است.

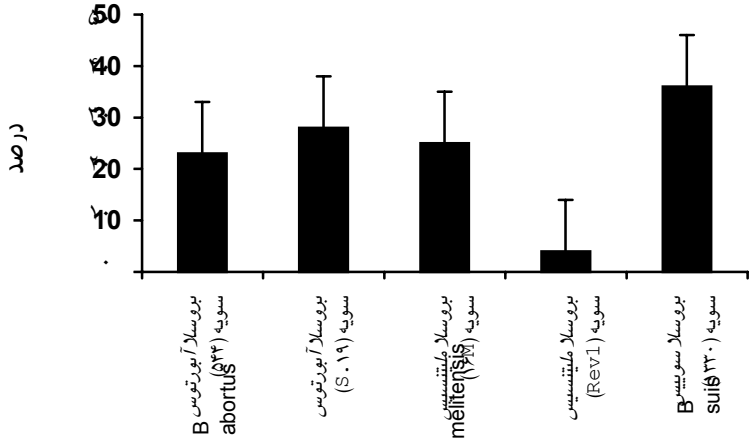
اطلاعات مربوط به رشد باکتری ها در پلیت های گرادیان دو بعدی با وضعیت مورد انتظار تئوریک مقایسه و به صورت درصد میزان رشد مورد انتظار محاسبه شد که در *نمودار ۲* آمده است. در مجموع، میزان رشد باکتری ها در شرایط حضور دو عاملpH و نمک طعام به صورت توأم کاهش چشمگیری نسبت به وضعیت مورد انتظار تئوریک نشان می دهد ، که این کاهش بین ۶۳٪ تا ۹۵٪ متغیر بود (Error Bar نشان دهنده انحراف معیار است). لازم به ذکر است در بین باکتری های مورد آزمایش *بروسلا ملیتنسیس* سویهRev۱ و *بروسلا سوییس* سویه ۱۳۳۰ به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر پذیری را نسبت به دو عامل فوق نشان دادند.

**جدول ۱:** میانگین pH و غلظت نمک (٪) باز دارنده از رشد ۵ سویه جنس بروسلا در پلیت های گرادیان یک بعدی pH و NaCl و دوبعدیpH-NaCl

| باکتری ها | ٪غلظت نمک بازدارنده از رشددر پلیت یک بعدی (٪ غلظت نمک بازدارنده از رشددر پلیت دو بعدی) | مقادیرpH بازدارنده از رشددرپلیت یک بعدی (مقادیرpH بازدارنده از رشددرپلیت دو بعدی) |
|---|---|---|
| *بروسلا آبورتوس* سویه ۵۴۴ | > ۱/۱ ± ۰/۰۲ (>۱/۱ ± ۰/۰۱) | <۵/٤ ± ۰/۱ (<۶/۲ ±۰/۲) |
| *بروسلا آبورتوس* سویه S.۱۹ | > ۱/٤۶ ±۰/۰۱۵ (>۱/۱ ±۰/ ۰۱۵) | < ۵/٤ ±۰/۱۵ (< ۵/٤ ± ۰/۲) |
| *بروسلا ملیتنسیس* سویه ۱۶M | > ۱/٤۶ ± ۰/۰۱ (>۰/۹۷ ±۰/۰۱) | < ۵/٤ ± ۰/۳ (< ۵/٤ ±۰/۲۵) |
| *بروسلا ملیتنسیس* سویه Rev1 | > ۱/٤۶ ±۰/۰۲ (>۰/۹۷ ±۰/۰۱۵) | < ۵/٤ ± ۰/۱۶ (< ۵/٤ ±۰/۳) |
| *بروسلا سوئیس* سویه ۱۳۳۰ | > ۱/٤۶ ±۰/۰۳ (>۱/۹۳ ±۰/۰۳) | < ٤/۸ ±۰/۲۵ (< ۵/٤ ± ۰/۲) |

1. Blank

نمودار ۱: میزان رشد *بروسلا ملیتنسیس* (Rev۱)در محیط کشت پایه ای BHIYEGA و شرایط مختلف غلظت نمک طعام و pH در پلیت های گرادیان پس از ۴ روز انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتیگراد (الف: گرادیان یک بعدی pH و غلظت نمک ثابت ۰/۶۹٪، ب: گرادیان یک بعدی نمک طعام و pH ثابت ۷/۱ ج: وضعیت مورد انتظار [تئوریک: حاصل جمع موارد الف و ب]، وضعیت عملی گرادیان دوبعدی [ عمودی pH و نمک طعام])




نمودار ۲: درصد میزان رشد سویه های مختلف بروسلا نسبت به میزان رشد مورد انتظار (بدون در نظر گرفتن اثرات متقابل نمک و pH) در پلیت های گرادیان دو بعدی

## بحث

بررسی در مورد اثر متغیرهای چند تایی مشکل و مستلزم استفاده از مواد و وسایل آزمایشگاهی معتنابه و صرف وقت است. ضمناً میزان خطای احتمالی نسبتاً بالایی دارد(۸).

در گذشته اثر عوامل فیزیک وشیمیایی و اغلب به صورت منفرد مورداستفاده قرار می گرفت، امادرسالهای اخیر به منظور رفع این نقیصه برای بررسی اثر متغیرهای چندتایی بعضاً از روش پلیت گرادیان دو بعدی استفاده می شود(۱۸).

یافته های این تحقیق نشان می دهدکه pH بازدارنده از رشد چهار سویه مورد آزمایش به جز *بروسلاسوییس* کمتر از ۵/٤ است. مطالعه انجام شده توسط داهر و ناواس نیز نشان می دهد که رشد *بروسلاملیتنسیس* در کمتر از سه هفته در pH = ۵ و در طی یک روز در pH =٤ متوقف می شود (۲) .

غلظت نمک اثر واضحی بر رشد میکروارگانیسم ها در غلظت های مختلف $H^+$ دارد . افزودن ۰/۲ مولار کلرور سدیم به محیط کشت باکتری *آلکالیجنس فیکالیس* موجب می شود که این باکتری دامنه وسیع تری از تغییرات pH را تحمل کند (۱۹) . با توجه به این مطلب رشد *بروسلاسوییس* در محدوده بیشتری ازpH در مقایسه با چهار باکتری دیگر مشخص در این تحقیق، شاید قابل توجیه باشد، چرا که برای این باکتری ( بروسلا سوییس ) در پلیت گرادیان یک بعدی به جای غلظت نمک ۰/٦۹٪ از غلظت نمک ۰/۹۳٪ استفاده شده است.

بر اساس جدول ارایه شده مشخص می شود که میزان تحمل نمک برای *بروسلا آبورتوس* ٥٤٤ از همه کمتر و برای *بروسلا سوییس* از همه بیشتر است. حداکثر میزان رشد تحت شرایط آزمایش برای *بروسلاسوییس* در ۰/۱۵ مولار و برای بقیه باکتری های مورد آزمایش در ۰/۱ مولار کلرور سدیم در pH خنثی صورت می پذیرد و میزان مطلوب غلظت نمک برای سویه های مختلف جنس بروسلا در «دست نامه باکتری شناسی سیستمیک» ۰/۰۵تا ۰/۱۵ مولار کلرور سدیم ذکر شده است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد(۱٤) .

پدیده مشترکی که در مورد سویه های *بروسلا آبورتوس* و *ملیتنسیس* در پلیت های گرادیان دو بعدی مشاهده می شود این است که میزان تحمل نمک این باکتری ها درpH نزدیک خنثی بیشتر است ، زیرا بیشتر ارگانیسم ها قادرند درpH نزدیک خنثی در مقایسه با pH اسیدی یا قلیایی غلظت زیاد نمک یا رطوبت کم را بیشتر تحمل کنند (۲۰).

شدت اثر دو عامل pH و غلظت نمک به صورت توأم در حد ممانعت کنندگی از رشد باکتری های مورد آزمایش به مراتب بیشتر از اثری بودکه هریک از این عوامل به طور جداگانه از خود نشان دادند، به طوری که بر روی رشد *بروسلا سوییس* افزایش اثری نزدیک به سه برابر و در مورد *بروسلا ملیتنسیس* سویهRev۱ افزایش اثری نزدیک به بیست برابر مشاهده شد. کاهش میزان رشد ناشی از اثر دو عامل به طور همزمان بر روی رشد سایر باکتری ها نیز گزارش شده است (۸).

شایان ذکر است که در این مطالعه اثر دو عامل pH و نمک طعام بر روی سویه های مختلف جنس بروسلا در محیط کشت بررسی شده است. در صورت استفاده از این دوعامل در محصولات غذایی لبنی از جمله پنیر باید به pH محصولات لبنی و تأثیر متقابل ترکیبات مواد غذایی و نمک بر روی یکدیگر و حفظ کیفیت آنهاتوجه کرد. داهر و ناواس نشان دادند که الگوی رشد و بقای *بروسلا ملیتنسیس* در محصولات لبنی مختلف ( شیر ، ماست ، پنیر و دوغ ) و در محیط های مایع مناسب در همانpH تقریباً یکسان است. در بررسی تغییرات حرارت وpH روی رشد و بقای *بروسلا آبورتوس* نیز به نتایج مشابهی دست یافته اند (۲).

طبق نتایج به دست آمده در تحققین فوق الذکر میزان بقا *بروسلا ملیتنسیس* در پنیر بیش از محصولات لبنی مورد آزمایش بوده است. این باکتری قادر است که در پنیر به مدت طولانی تری در مقایسه با سایر محصولات لبنی باقی بماند. از طرف دیگر ، رشد *بروسلا ملیتنسیس* در شیر و محصولات لبنی حاوی فلور طبیعی، به دلیل فعالیت این فلورا ( اساساًلاکتوباسیل ها )و تولید محصولات اسیدی محدود می‌شود. بنابراین از طریق تعیین pH محصول و نوع اسید ایجاد شده می توان نقش محصولات لبنی را به عنوان ناقل بروسلا پیش بینی کرد و از میان محصولات لبنی مختلف احتمالاً پنیر نرم در مقایسه با شیر و ماست بیشترین نقش را در انتقال باکتری ایفا می‌کند (۲و۲۰).

در نهایت با توجه به نتایج بررسی حاضر که در آن اثرات ضد بروسلاییpH اسیدی و غلظت نمک طعام بالا به صورت توأم تشدید می شود، به کارگیری توأم این دو عامل برای نگهداری مواد لبنی به خصوص برای حذف بروسلاها توصیه می شود، هر چند اجرای عملی و وسیع این پیشنهاد مستلزم بررسی کارآیی این روش بر روی مواد لبنی واقعی است.

## References


۱. زینالی، ع. مروری بر روشهای تشخیص سرولوژیک و آلرژیک بروسلوز. پژوهش و سازندگی ،۱۳۷۳ ، سال ششم ، شماره ۲۲، صص ۱٤۵-۱٤۳

2. EI-Daher N, Nawas T, Qaderi S: The effect of the pH of various dairy products on the survival and growth of *Brucella mellitensis. Ann Trop Med Prasitol* 1990; 84 (5): 523-528.

3. Salata RA; Brucellosis. In:Goldman L, Bennett JC , Drazen JM(eds). Cecil Textbook of Medicine. Vol 3, 21st ed. Philadelphia,W.B.Saunders Co, 2000; PP: 1717-1719.

4. Young EJ. Brucellosis. In: Humes DH, Dupont HL, Gardner LB, Griffin JW (eds). Kelley's Textbook of Internal Medicin. 4th ed. Philadelphia, Lippincott, Williams and Wilkins, 2000; PP: 2015-2017.

۵. ولایتی ع، صائبی ا ، محرز م ویلدا ع . بیماریهای عفونی، جلداول ، انتشارات روزبهان ،تهران ،۱۳٦۵،صص ۵۹-۸۹ .

۶. حداد خداپرست م، ثرهوش ر، ناصحی ب، رضایی مکرم ر. میکروبیولوژی غذایی مدرن، نشر مشهد،۱۳۷۲،صص ۱۱۱-۷۳.

7. Wimpenny JWT. Responses of microorganisms to physical and chemical gradients. Phil. Trans. R. Soc Lond B 1982; 297: 497-515.

8. Thomas LV, Wimpenny JWT, Peters AC. An investigation of the effect of four variables on the

growth of *Salmonella Typhimurium* using two types of gradient gel plates. Inter J Food Microbiol 1991; 14: 261-275.
9. Peter AC. Using image analysis to map bacterial growth on solid media. Binary 1990; 2: 73-75 .
10. Peter AC, Thomas L, Wimpenny JWT. Effects of salt concentration on bacterial growth on plates with gradients of pH and temperature. FEMS Microbial Lett 1991; 77: 309-314.
11. Thomas LV,Wimpenny JWT.Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogen* and *Staphylococcus aureus*. Appl Environ Microbiol 1996; 62(6): 2006-2012.
12. Wimpenny JWT, Waters P. Growth of micro-organism in gel-stabilized two dimensional diffusion gradient system. J Gen Microbiol 1984; 130: 2921-2926.
13. Wimpenny JWT, Waters P: The use of gel-stabilized gradient plates to map the responses of microorganisms to three or four enviromental factors varied simultaneously. FEMS Microbial Lett 1987; 40: 263-267.
14. Brinley-Morgan WJ, Deley J, Dye DW, Larsen H, Vincent JM, Whittenburg R. Gram-negative aerobic rods and cocci. In: Krieg NR, Holt JC(eds): Bergey's manual of systemic bacteriology. Vol 1, Baltimore: Williams and Wilkins, 1984; PP: 377-388.
15. Farrell ID. Brucella. In: Collee JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP (eds). Mackie and Mccartney Practical Medical Microbiology. 13th ed. New York, Churchill Livingstone, 1989; PP:525-530.
16. Baron EJ, Finegold SM. Bailey and scott's Diagnostic Microbiology. 8th ed St. louis, Mosby Co, 1990; PP: 8-16
17. Venables WA, Wimpenny JWT, Ayres A, Cook SM, Thomas LV. The use of two-dimensional gradient plates to investigate the range of conditions under which conjugal plasmid transfer occurs. Microbiology 1995; 141: 2713-2718 .
18. Waters P, Lloyd D. Salt, pH and temperature dependencies of growth and bioluminescence of three species of luminous bacteria analysed on gradient plates. J Gen Microbiol 1985; 131: 2865-2869.

۱۹. حلـــم سـرشـــت پ، دل پیشـه ا .اصول تغذیه و بهداشت مواد غذایی، انتشارات چهر، ۱۳۷٤، صص ۲۷۳-۲٤۳.

20. Frazier WC, Westhoff DC. Food microbiology. 3rd ed. McGraw-Hill Co, New York, 1978; PP: 4-9.