ارزیابی امکان حساس کردن لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 به شرایط اسیدی به‌وسیله عصاره پوست پرتقال

مهدی زارعی[۱]، مهدی پورمهدی بروجنی[۲]، لیلا نیک‌روان[۳*]

(تاریخ دریافت۱۳۹۶/۷/۱۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۹/۱۵)

چکیده

توانایی باکتری‌ها در تحمل pHهای پایین از جمله خصوصیات مهمی است که به زنده‌مانی باکتری در محیط‌های مختلف کمک می‌نماید. لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 توانایی زیادی در زنده‌مانی در محیط‌های اسیدی دارد. در مطالعه حاضر توانایی عصاره پوست پرتقال جهت حساس کردن لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 به شرایط اسیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور سلول‌های لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 (با تعداد تقریبی 10^5 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر) به محیط‌های TSB با pH برابر با ۴ و ۵ ایجاد شده به‌وسیله اسیدهای استیک و لاکتیک به‌طور جداگانه و حاوی غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد از عصاره پوست پرتقال تلقیح شدند. تعداد باکتری‌های زنده قبل و پس از ۶ ساعت مواجهه با محیط به روش کشت سطحی بر روی محیط TSA شمارش گردید. بر اساس نتایج این تحقیق غلظت ۰/۵ درصد عصاره پوست پرتقال تأثیری بر میزان زنده‌مانی باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 در شرایط اسیدی مورد آزمایش نداشت ($p>0/05$). اما غلظت ۱ درصد عصاره پوست پرتقال توانست که سلول‌های لیستریا مونوسیتوژنز را به pHهای ۴ و ۵ ایجاد شده توسط اسید لاکتیک و اسید استیک حساس‌تر کند($p<0/05$). نتایج مشابهی در مورد اشریشیا کلای O157:H7 به‌دست آمد. بنابراین غلظت ۱ درصد عصاره پوست پرتقال می‌تواند میزان غیرفعال شدن باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 در طی مواجهه با pHهای پایین و اسیدهای آلی را افزایش دهد.

واژگان کلیدی: لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلای O157:H7 ، عصاره پوست پرتقال.

---

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.

۲. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.

۳. دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران.

مقدمه

از سال‌های دور تحقیقات بسیاری در رابطه با تحمل اسیدی باکتری‌های غذایی و تأثیر اسیدهای مختلف بر آن‌ها انجام شده است. در کتب و منابع علمی مرتبط با میکروبیولوژی مواد غذایی نیز، تقریباً در مورد اکثر پاتوژن‌های غذایی، مطالبی در رابطه با محدوده‌ی pH قابل تحمل، محدوده‌ی pH قابل رشد، تأثیر اسیدهای مختلف و مکانیسم‌های دخیل در تحمل اسیدی آن‌ها یافت می‌شود (مرتضوی و صادقی ماهونک، ۱۳۸۱؛ مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۲؛ مرتضوی و همکاران، ۱۳۷۹).

لیستریا *مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلای* O157:H7 از جمله باکتری‌های مهم پاتوژن غذایی می باشند که از طیف وسیعی از مواد غذایی نظیر شیر، محصولات لبنی، گوشت و مواد غذایی گوشتی جداسازی شده و بر اساس نتایج مطالعات مختلف از تحمل بالایی نسبت به شرایط اسیدی برخوردارند. اگر چه که میزان این تحمل اسیدی به نوع اسید به‌کار رفته نیز بستگی دارد. از این رو توجه زیادی به کنترل این باکتری‌ها در مواد غذایی معطوف شده است (Chikindas and Gandhi, 2007; Cheroutre-Vialette et al., Farrokh et al., 2013 ; Aygun and Pehlivanlar, 2006 ; 1998).

در پاره‌ای از تحقیقات صورت گرفته بر روی آن دسته از پاتوژن‌های غذایی که به طور طبیعی مقاومت اسیدی بالایی دارند، روش‌های افزایش حساسیت آن‌ها نسبت به شرایط اسیدی نیز مورد مطالعه قرار گرفته است. به عنوان مثال از اتانول جهت افزایش حساسیت *اشریشیا کلای* O157:H7 و *لیستریا مونوسیتوژنز* به شرایط اسیدی استفاده شده است (Jordan et al., 1999; Park and Barker, 2001).

افزایش حساسیت نسبت به شرایط اسیدی از نقطه نظر کنترل باکتری‌های مقاوم به شرایط اسیدی در مواد غذایی با توجه به دامنه pH مواد غذایی حائز اهمیت فراوانی است اما از طرف دیگر عدم تمایل مصرف کنندگان به استفاده از غذاهای حاوی نگهدارنده‌های شیمیایی و نگرانی‌های آنان در مورد اثرات وجود این نگهدارنده‌ها در مواد غذایی روز به روز در حال افزایش است. این مسأله محققین علوم و صنایع غذایی را به سوی یافتن و استفاده از مواد با منشأ طبیعی به عنوان نگهدارنده یا تقویت کننده اثر نگهدارنده در مواد غذایی ترغیب نموده است. به همین دلیل در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات به‌دست آمده از گیاهان و میوه‌ها جهت بهبود کیفیت و افزایش مدت زمان نگه‌داری مواد غذایی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

بدین جهت تحقیق حاضر با هدف ارزیابی امکان حساس کردن لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 به شرایط اسیدی به‌وسیله عصاره پوست پرتقال ، طراحی گردید.

روش کار

میکروارگانیسم‌ها

باکتری‌های *لیستریا مونوسیتوژنز* (ATCC 7644) و *اشریشیا کلای* O157:H7 (ATCC 43895) که به صورت کشت ذخیره حاوی گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌شد، جهت فعال‌سازی به محیط TSB منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

آماده کردن مایه‌ی تلقیح

میزان ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی میکروارگانیسم‌های فعال شده مورد آزمایش به ۵ میلی-لیتر محیط TSB تلقیح شد و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، اقدام به رقیق‌سازی متوالی و کشت سطحی بر روی محیط کشت TSA گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی-گراد به مدت ۳۶-۲۴ ساعت انکوبه 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 باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 پس از ۲۴ ساعت مشخص گردید. جهت انجام آزمایشات بعدی با رقیق سازی کشت ۲۴ ساعته به‌وسیله محیط TSB استریل، دوز مورد نظر تلقیح یعنی 10^5 واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی در میلی-لیتر تهیه شد.

تهیه‌ی محیط کشت TSB با pH برابر با ۴ و۵ به-وسیله اسیدهای لاکتیک و استیک

بدین منظور ابتدا محلول‌های ذخیره غلیظ اسید لاکتیک (۱۲ مولار) و اسید استیک (۱۷/۴ مولار) تهیه و به کمک فیلتر سرنگی استریل گردید. پس از تهیه TSB استریل، اسیدهای تهیه شده به میزانی به محیط‌ها اضافه گردید که pHهای مورد نظر یعنی ۴ و ۵ به دست آید.

بررسی تأثیر عصاره پوست پرتقال در افزایش حساسیت لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 نسبت به شرایط اسیدی

جهت بررسی تأثیر یا عدم تأثیر غلظت‌های غیر کشنده عصاره پوست پرتقال در افزایش حساسیت لیستریا مونوسیتوژنز و اشریشیا کلای O157:H7 نسبت به شرایط اسیدی، هر کدام از باکتری‌های مذکور به‌طور جداگانه و با دوز تلقیح حدود 10^5 CFU/ml به ۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB با pHهای برابر با ۴ و ۵ که به-وسیله اسیدهای استیک یا لاکتیک ایجاد شده بود (گروه کنترل) تلقیح گردید. همچنین هر کدام از باکتری‌های مذکور به‌طور جداگانه به محیط‌هایی با شرایط مشابه اما حاوی غلظت‌های غیر کشنده عصاره پوست پرتقال (۰/۵ و ۱ درصد) 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 تلقیح شده به مدت ۶ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس به منظور تعیین تعداد باکتری‌های زنده باقی‌مانده اقدام به رقیق سازی متوالی و کشت بر روی محیط TSA گردید. همه‌ی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

آنالیز آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ به طور توصیفی و تحلیلی بررسی شدند. تحلیل داده‌ها با آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون تکمیلی LSD و آزمون t برای دو نمونه مستقل انجام گرفت.

نتایج

تأثیر عصاره پوست پرتقال در افزایش حساسیت لیستریا مونوسیتوژنز نسبت به شرایط اسیدی

همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد عصاره پوست پرتقال در غلظت ۰/۵ درصد تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌های زنده *لیستریا مونوسیتوژنز* در pH برابر ۵ ایجاد شده توسط اسیدهای لاکتیک و استیک در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه نداشت ($P>0/05$). اما با افزایش غلظت به ۱ درصد عصاره پوست پرتقال کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های زنده این باکتری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید ($P<0/05$). همچنین در مقایسه اسیدهای لاکتیک و استیک، نتایج اگرچه به‌طور کلی حاکی از حساسیت بیشتر *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به اسید لاکتیک در مقایسه با اسید استیک بود اما این تفاوت نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود ($P>0/05$).

با کاهش pH محیط به ۴، تعداد سلول‌های زنده باکتری هم در گروه کنترل و هم در تیمارهای مختلف انجام شده کاهش یافت. اما در این مورد نیز عصاره پوست پرتقال در غلظت ۰/۵ درصد تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌های زنده *لیستریا مونوسیتوژنز* در حضور هر دو اسید استفاده شده در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه نشان نداد ($P>0/05$). این در حالی است که با

افزایش غلظت به ۱ درصد عصاره پوست پرتقال کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده این باکتری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۵). همچنین در مقایسه اسیدهای لاکتیک و استیک، نتایج اگرچه به‌طور کلی حاکی از حساسیت بیشتر *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به اسید لاکتیک در مقایسه با اسید استیک بود اما این تفاوت نیز از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

تأثیر عصاره پوست پرتقال در افزایش حساسیت *اشریشیا کلای* O157:H7 نسبت به شرایط اسیدی

همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌گردد عصاره پوست پرتقال در غلظت ۰/۵ درصد تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌های زنده *اشریشیا کلای* O157:H7 در pH برابر ۵ ایجاد شده توسط اسیدهای لاکتیک و استیک در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه نداشت (P>۰/۰۵). اما با افزایش غلظت به ۱ درصد عصاره پوست پرتقال کاهش معنی‌داری در تعداد سلول‌های زنده این باکتری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۵). همچنین در مقایسه اسیدهای لاکتیک و استیک، تفاوت آماری معنی‌داری بین تعداد سلول‌های باکتری در محیط‌های حاوی این دو اسید مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

با کاهش pH محیط به ۴، تعداد سلول‌های زنده باکتری هم در گروه کنترل و هم در تیمارهای مختلف انجام شده کاهش یافت. اما در این مورد نیز عصاره پوست پرتقال در غلظت ۰/۵ درصد تأثیر معنی‌داری در کاهش تعداد سلول‌های زنده *اشریشیا کلای* O157:H7 در حضور هر دو اسید استفاده شده در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه نشان نداد (P>۰/۰۵). این در حالی است که با افزایش غلظت این به ۱ درصد عصاره پوست پرتقال کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌های زنده این باکتری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده گردید (P<۰/۰۵). همچنین در مقایسه اسیدهای لاکتیک و استیک، تفاوت آماری معنی‌داری بین تعداد سلول‌های باکتری در محیط‌های حاوی این دو اسید مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

جدول ۱- تأثیر عصاره پوست پرتقال بر *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط TSB با ۵ =pH ایجاد شده توسط اسید لاکتیک و اسید استیک

محیط TSB با ۵=pH ایجاد شده توسط	کنترل	عصاره پوست پرتقال (درصد)	
		۰/۵	۱
اسید لاکتیک	۴/۳۸±۰/۲۵a	۴/۱۶±۰/۲۷a	۳/۳۲±۰/۱۸b
اسید استیک	۴/۶۶±۰/۲۱ a	۴/۴۸±۰/۱۹a	۳/۷۳±۰/۲۳ b

- اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر پس از شش ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه در حدود ۵ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر بوده است.

- اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار (p < ۰/۰۵) می باشند.

جدول ۲- تأثیر عصاره پوست پرتقال بر *لیستریا مونوسیتوژنز* در محیط TSB با ۴ =pH ایجاد شده توسط اسید لاکتیک و اسید استیک

محیط TSB باpH=4 ایجاد شده توسط	کنترل	عصاره پوست پرتقال (درصد)	
		۰/۵	۱
اسید لاکتیک	۳/۷۶±۰/۱۸a	۳/۵۵±۰/۱۶a	۱/۶۴±۰/۱۳b
اسید استیک	۳/۹۱±۰/۱۱a	۳/۷۶±۰/۲۸ a	۱/۵۹±۰/۱۹b

- اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر پس از شش ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه در حدود ۵ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر بوده است.

- اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار ($p < ۰/۰۵$) می باشند.

جدول ۳- تأثیر عصاره پوست پرتقال بر *اشریشیا کلای* O157:H7 در محیط TSB با ۵ =pH ایجاد شده توسط اسید لاکتیک و اسید استیک

محیط TSB با pH=۵ ایجاد شده توسط	کنترل	عصاره پوست پرتقال (درصد)	
		۰/۵	۱
اسید لاکتیک	۴/۹۴±۰/۱۶a	۴/۵۸±۰/۲۵a	۳/۱۸±۰/۲۲c
اسید استیک	۵/۰۳±۰/۱۷a	۴/۷۳±۰/۲۴ a	۳/۲۷±۰/۱۳ c

- اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر پس از شش ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه در حدود ۵ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر بوده است.

- اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار ($p < ۰/۰۵$) می باشند.

جدول ۴- تأثیر عصاره پوست پرتقال بر *اشریشیا کلای* O157:H7 در محیط TSB با pH= ۴ ایجاد شده توسط اسید لاکتیک و اسید استیک

محیط TSB با pH=۴ ایجاد شده توسط	کنترل	عصاره پوست پرتقال (درصد)	
		۰/۵	۱
اسید لاکتیک	۴/۰۹±۰/۲۳a	۳/۶۶±۰/۲۷a	۱/۹۴±۰/۱۱c
اسید استیک	۴/۱۲±۰/۲۶a	۳/۷۳±۰/۲۴a	۱/۸۱±۰/۱۸c

- اعداد ارائه شده میانگین ± انحراف معیار تعداد باکتری زنده بر مبنای لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر پس از شش ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مربوط به سه تکرار مجزا می‌باشد. تعداد باکتری اولیه در حدود ۵ لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی‌لیتر بوده است.
- اعداد ارائه شده در هر ردیف که حروف انگلیسی کوچک غیر مشابه دارند دارای تفاوت معنی دار ($p < ۰/۰۵$) می باشند.

بحث

مسأله زنده‌مانی باکتری‌های پاتوژن غذایی در مواد غذایی که به‌صورت طبیعی دارای اسید و در نتیجه pH پایین می‌باشند و یا مواد غذایی که به منظور حفظ و بهبود کیفیت میکروبی آن‌ها، از اسیدهای آلی استفاده شده است از نظر حفظ سلامت مصرف‌کنندگان بسیار حائز اهمیت است.

نکته‌ی دیگری که در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه بوده است افزایش کارایی نگهدارنده‌های اسیدی از طریق افزایش حساسیت باکتری‌ها به شرایط اسیدی به‌خصوص در مورد باکتری‌هایی که به‌طور طبیعی مقاومت بالایی نسبت به شرایط اسیدی دارند، می‌باشد. در این رابطه از ترکیبات مختلفی همراه با اسیدهای آلی استفاده شده است. 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 دیواره 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 هایپراسموتیک و هیپواسموتیک نیز مشاهده می‌شود. در این موارد نیز افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری به‌وسیله اتانول، عامل اختلال در توزیع مناسب یون‌ها در داخل سیتوپلاسم باکتری بوده و باعث افزایش میزان مرگ باکتری می شود.

زارعی و همکاران (۱۳۹۳) توانایی اتانول و EDTA را جهت حساس کردن *مرگانلا مرگانی* به pHهای پایین و اسیدهای آلی مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند که اتانول در غلظت ۵ درصد و EDTA در غلظت ۷/۵ میلی مولار باعث حساس شدن سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* نسبت به شرایط اسیدی شدند. همچنین استفاده همزمان اتانول و EDTA اثرات قوی‌تری را بر مقاومت اسیدی این باکتری نشان داد به‌طوری‌که در حضور همزمان این دو عامل، کمترین میزان زنده‌مانی سلول‌های فاز لگاریتمی و سکون رشد *مرگانلا مرگانی* مشاهده گردید.

EDTA به عنوان یک ترکیب ضد میکروب شناخته نمی‌شود بلکه به عنوان یک تقویت‌کننده موثر بر سایر مواد ضد میکروبی شناخته می‌شود. این ترکیب با جذب کاتیون‌های دو ظرفیتی باعث آسیب به لایه لیپوپلی‌ساکاریدی و رها شدن تا ۴۰ درصد از لیپوپلی‌ساکارید دیواره باکتری‌های گرم منفی شده در نتیجه موجب افزایش نفوذپذیری دیواره سلولی آن‌ها می‌شود (Alakomi et al., 2003; Lambert et al., 2004). بنابراین سایر مواد ضد میکروبی به‌راحتی می‌توانند وارد سلول باکتری شوند و اثرات خود را بگذارند. از این رو به ترکیباتی نظیر EDTA، نفوذپذیرکننده گویند. استفاده از ترکیبات نفوذپذیرکننده مجاز در مواد غذایی به همراه سایر مواد ضد میکروبی راهی مناسب جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم منفی فسادزا و بیماری‌زا در مواد غذایی می‌باشد (Helander et al., 1997).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال فاقد هرگونه اثر ضد میکروبی بر دو باکتری مورد مطالعه، البته تا غلظت ۱ درصد در محیط کشت، بود. در همین رابطه Karabıyıklı و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که اثر ضد میکروبی آب نارنج بر روی *سالمونلا تایفی موریوم* و *لیستریا مونوسیتوژنز* تنها به دلیل pH پایین و خاصیت اسیدی آن می‌باشد و در صورت خنثی کردن خاصیت اسیدی آن هیچ‌گونه اثر ضد میکروبی از آن مشاهده نمی‌شود.

در مقابل، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره آبی پوست پرتقال در صورت استفاده در غلظت ۱ درصد قادر بود که میزان زنده‌مانی *لیستریا مونوسیتوژنز* و *اشریشیا کلای* O157:H7 را در محیط اسیدی شده به‌وسیله اسید لاکتیک یا اسید استیک به میزان قابل توجهی کاهش دهد اما این اثر در غلظت ۰/۵ درصد مشاهده نگردید.

Bruno-Barcena و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان دادند که اثرات سیتوتوکسیک استرس اسیدی و استرس اکسیداتیو بسیار به هم شبیه‌اند و آنزیم‌های آنتی-اکسیدان نظیر سوپراکسید دیسموتاز در افزایش مقاومت اسیدی *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* و *اشریشیا کلای* نسبت به شرایط اسیدی نقش مهمی دارند. Vurma و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ تأثیر استفاده از ترکیبات فنولی مختلف را بر افزایش حساسیت *لیستریا مونوسیتوژنز* نسبت به فشار بالا مورد بررسی قرار دادند و نتایج مثبتی را در این زمینه گزارش نمودند.

بنابراین می‌توان گفت که اثرات مشاهده شده از عصاره آبی پوست پرتقال احتمالاً به دلیل مهار آنزیم‌های آنتی-اکسیدان طبیعی باکتری‌های مورد مطالعه به‌وسیله ترکیبات پلی‌فنلی و آنتی‌اکسیدان طبیعی موجود در عصاره آبی پوست پرتقال می‌باشد. اگرچه که جهت ارائه یک توجیه دقیق و علمی، اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان باکتری نظیر سوپراکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز در هنگام مواجهه با استرس اسیدی و همچنین در حضور ترکیباتی نظیر عصاره پوست پرتقال ضروری می‌باشد.

منابع:

۱. زارعی، مهدی.، پورمهدی بروجنی، مهدی.، جزایری، سید علی. (۱۳۹۳). ارزیابی امکان حساس کردن *مرگانلا مرگانی* به شرایط اسیدی به وسیله اتانول و EDTA ، مجله دامپزشکی ایران، دوره دهم، شماره۲، صفحه ۲۸-۱۹.

۲. ۲. مرتضوی، سیدعلی.، حدادخداپرست، محمدحسین.، فرهوش، رضا.، رضائی¬مکرم، رضا.، ناصحی، بهزاد. (۱۳۷۲). میکروبیولوژی غذایی مدرن، تألیف: جی جیمز ام، جلد اول، چاپ اول، انتشارات نشر مشهد، مشهد مقدس،صفحه ۱۰۵ -۷۳.

۳. ۳. مرتضوی، سیدعلی.، صادقی ماهونک، علیرضا. (۱۳۸۱). میکروبیولوژی غذایی، تألیف: ادمز ام آر و موس ام آ، چاپ چهارم، ویرایش دوم، انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد مقدس، صفحه ۶۲-۲۹، ۱۴۰-۱۳۱.

۴. ۴. مرتضوی، سیدعلی.، کاشانی¬نژاد، مهدی.، ضیاءالحق، حمیدرضا. (۱۳۷۹). میکروبیولوژی مواد غذایی، تألیف: فریزیر ویلیام سی و وستهوف دنیس سی، چاپ سوم، انتشارات دانشگاه فردوسی، مشهد مقدس، صفحه۳۱-۱۶، ۴۱۸.

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

6. Aygun, O. and Pehlivanlar, S. (2006). Listeria spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control. 17: 676–679.

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

8. Bruno-Barcena, JM., Andrea Azcarate-peril, M. and Hasan, HM. (2010). Applied and Environmental Microbiology. 76(9): 2747.

9. Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, JC. and Lebert, A. (1998). Effects of pH or a stress on growth of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 42: 71-77.

10. Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., Thevenot, D., Condron, R.., Reu, KD., Govaris, A., Heggum, K., Heyndrickxi, M., Hummerjohann, J., Lindsay, D., Miszczycha, S., Moussiegt, S., Verstraete, K. and Cerf, O. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. International Journal of Food Microbiology. 162 (2): 190-212.

11. Gandhi, M., Chikindas, ML. (2007). Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology. 113: 1–15.

12. Helander, lM., Alakomi, HL., Latva-Kala, K. and Koski, P. (1997). Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. Microbiology. 143: 3193-3199.

13. Jordan, SL., Glover, J., Malcom, L., Thomson-Carter, FM., Booth, IR., Park, SF., 1999. Augmentation of killing of *Escherichia coli* O157 by combinations of lactate, ethanol, and low-pH conditions. Applied and Environmental Microbiology. 65: 1308–1311.

14. Karab$_1$y$_1$kl$_1$, S., Degirmenci, H., Karap$_1$ar, M. (2014). Inhibitory effect of sour orange (Citrus aurantium) juice on *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. LWT-Food Science and Technology. 55: 421-425.

15. Lambert, RJW., Hanlon, GW. and Denyer, SP. (2004). The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Applied Microbiology. 96: 244–253.
16. Vurma, M., Chung, Y., Shellhammer, TH., Turek, EJ., Yousef, AE., 2006. Use of phenolic compounds for sensitizing *Listeria monocytogenes* to high-pressure processing. International Journal of Food Microbiology. 106: 263-269.