التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus plantarum* وبعض التوابل في نمو بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم البقري المفروم

جيهان عبد الستار سلمان ،غادة محمد خليل و رغد عبد اللطيف عبد الرزاق
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية

الخلاصة

درس التأثير التثبيطي لكل من بكتريا *Lactobacillus plantarum* لوحدها تجاه بكتريا *Escherichia coli* O157:H7 في اللحم البقري المفروم ، ودرس كذلك تأثيربعض التوابل التي شملت : الثوم، والقرنفل، و الفلفل الأسود (كلا على أنفراد) ضد هذه البكتريا، وأستخدمت طريقة عد الأطباق لتقدير العدد الحي لبكتريا *E. coli* O157:H7 في نماذج اللحم المعاملة مدد الحضن(0 و 24 و 48) ساعة.

بينت النتائج وجود تأثير تثبيطي لبكتريا *L .plantarum* تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 عندما أدت الى خفض أعدادها بعد مرور 24 و 48 ساعة من الحضن، اذ وصلت أعدادها الى الصفر بعد مرور 48 ساعة من الحضن، كما أبدت جميع التوابل قيد الدراسة فعلا تثبيطيا تجاه البكتريا المذكورة وكان مسحوق الثوم المستعمل قد اعطى أعلى فعالية تثبيطية مقارنة بالتوابل الأخرى .

كما درس التأثير التثبيطي التأزري لدى خلط بكتريا *L.plantarum* مع كل من الثوم، والقرنفل، و الفلفل الأسود (كلا على أنفراد) ضد بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم أيضا. وأستخدمت طريقة العد نفسها أعلاه ، وقد أظهرت النتائج وجود تأثير تثبيطي تأزري يعود لكل من بكتريا *L.plantarum* من جهة والتوابل المستعملة من جهة أخرى ، ولوحظ ان أفضل تأثير تثبيطي تأزري مدة الحضن 24 ساعة كان لدى خلط بكتريا *L.plantarum* مع الثوم مقارنة بالتوابل الأخرى .

المقدمة

تتلوث الأغذية بالعديد من الأحياء المجهرية المرضية التي تعرض المستهلك الى تأثيرات غير مرغوبة يصطلح على تسميتها بالأمراض المحمولة بالغذاء(Food borne diseases) ، ويمكن ان تتصف بأمراضيتها الشديدة مما قد تسبب الوفاة لاسيما في المجتمعات التي تفتقر الى النظافة والعناية الصحية (1)، وتعد بكتريا *E.coli* O157:H7 مسببا مهما للأمراض المحمولة بالغذاء،فقد عرفت لأول مرة ممرضا" منتقلا" عبر الغذاء (Food borne Pathogen) عام 1982 عند ظهور 20 حالة تسمم غذائي سببها تناول الهمبركر ، وتشير الأحصائيات الى حدوث اكثر من 20000 أصابة سنويا في الولايات المتحدة منها 250 حالة وفاة سببها بكتريا *E.coli* O157:H7 (2).

تحدث الأصابة بهذه البكتريا عن طريق تناول الطعام والشراب الملوث بها ، وتكون الجرعة المطلوبة لأحداث الأصابة قليلة جدا (100– 200) خلية(3). وتنشأ الأصابة بهذه البكتريا من الأبقار التي تعد المخازن الرئيسة لها(4)، أذ تعد اللحوم والمنتجات المصنعة منها مصدرا رئيسيا" للأصابة بهذه البكتريا(2)، لذا فأن الحاجة الى طرائق جديدة للسيطرة على الممرضات في الغذاء أخذت حيزا كبيرا من اهتمام الباحثين في السنوات الأخيرة.

تستخدم بكتريا حامض اللاكتيك في حفظ الأغذية وسيلة حفظ حيوية (Biopreservatives) لقدرتها على تثبيط الأحياء المجهرية الأخرى (5) ، وتضم بكتريا حامض اللاكتيك أجناسا وأنواعا عديدة ، ويعد جنس *Lactobacillus*

في مقدمة تلك الأجناس (6) ،اذ يضم هذا الجنس أنواع عديدة مثـل *L. bulgaricus, L.fermentum , L. gasseri , L. acidophilus , L.plantarum , L.rhamnosus* (7).

تنتج بكتريا *Lactobacillus* العديد من المواد المثبطة التي تبدي تأثيرا تثبيطيا تجاه العديد من الممرضـات ، ويعود الفعل التثبيطي الى تجمع او تراكم المواد الأيضية الرئيسة مثل (حامض اللاكتيك، و حامض الخليك، و الكحول الأثيلي، و CO2) فضلا عن أنتاج المواد المثبطة الأخرى مثل بيروكسيد الهيدروجين والداي استيل والبكتريوسينات (8).

تضاف العديد من التوابل والأعشاب الى منتجات الأغذية المختلفة لأعطاء النكهة واللون فضلا عن الفعل التثبيطي الذي تبديه التوابل تجاه الأحياء المجهرية الذي يعزى الى الزيوت التي تحتويها (9). وهناك العديد من التوابـل ذي التأثير الكبير على الأحياء المجهرية في الأغذية وأكثرها شيوعا الثوم، و الخردل، والفلفل الحار والدارسين (10)، وتستخدم مثل هذه المواد في الأغذية كمواد مثبطة طبيعية (11)، ومثالها الثوم الذي يستعمل لأطالة مدة حفظ العديد من منتجات اللحوم مثل الباسطرمة، والهمبركر، والنقانق ،وبعض الأسماك، واللحوم المعلبة (10).

نظرا لقلة الدراسات المحلية حول أستعمل بكتريا *L.plantarum* مادة حافظة حيوية في اللحوم ودراسـة تأثيرهـا التأزري مع التوابل تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 فقد جاءت هذه الدراسة لتهدف الى أمكانيـة أسـتعمال بكتريـا *L.plantarum* مع التوابل في حفظ اللحوم ومنع نمو بكتريا *E. coli* O157:H7 المسببة للتسمم الغذائي .

المواد وطرائق العمل

-العزلات البكتيرية:

تم الحصول على عزلة من بكتريا *L.plantarum* وعزلة مـن بكتريـا *E. coli* O157:H7 مـن مختبـرات الدراسات العليا في قسم علوم الحياة – كلية العلوم _ الجامعة المستنصرية .

- تنمية العزلات البكتيرية:

نميت بكتريا *L.plantarum* في وسط MRS السائل وحضنت بدرجة حرارة 37 °م مدة 24 ساعة تحـت ظـروف لاهوائية (12) ،فيما نميت بكتريا *E. coli* O157:H7 في وسط Brain Heart Infusion (BHI) السائل وحضنت بدرجة حرارة 37 °م لمدة 24 ساعة.

-أنموذج اللحم المفروم:

تم الحصول على أنموذج اللحم البقري المفروم من الأسواق المحلية ، حفظ الانموذج في الثلاجة بدرجة 4 °م مدة 24 ساعة قبل الأستعمال .

-مساحيق التوابل :

أستعملت مساحيق ثلاثة أنواع من التوابل التي شملت الثوم، والقرنفل، و الفلفل الأسود بوصفها الأكثر شيوعا وأستعمالا" في تصنيع منتجات اللحم المفروم . تم الحصول على هذه التوابل من الأسواق المحلية .

-تقدير الفعالية التثبيطية لبكتريا *L.plantarum* والتوابل في اللحم المفروم:

لقح اللحم البقري المفروم ببكتريا *E. coli* O157:H7 (10^2) خلية / مليلتر ، بعدها عومل اللحم المفـروم الملقـح بثلاث معاملات شملت : بكتريا *L.plantarum* (10^5) خلية/ مليلتر لوحدها، توابل بنسبة 2% لكل من (مسـحوق الثوم، و القرنفل، و الفلفل الأسود) كلا على أنفراد وخليط من كل من :*L.plantarum* + التوابل المذكورة (كـلا على انفراد) ، وأعتمد أنموذج اللحم الملقح ببكتريا *E. coli* O157:H7 من دون أي معاملة سيطرة .حضنت نماذج

اللحم قيد الأختبار بدرجة حرارة 37 °م مدة 48 ساعة. قدر العدد الحي لبكتريا *E. coli* O157:H7 في نماذج اللحم مدد الحضن (0 و 24 و48) ساعة بطريقة عد الأطباق على وسط Eosin Methylen Blue(EMB) (13).

النتائج والمناقشة

-التأثير التثبيطي لبكتريا *Lactobacillus plantarum* تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم :

أختبر التأثير التثبيطي لخلايا بكتريا *Lactobacillus plantarum* الحية تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 لدى التنمية المشتركة في اللحم المفروم ، وقد بينت النتائج في الشكل (1) قابلية بكتريا *L.plantarum* على تثبيط نمو بكتريا *E. coli* O157:H7 عندما أدت الى خفض أعدادها بعد مرور 24 و 48 ساعة من التنمية المشتركة مقارنة مع معاملة السيطرة، اذ بلغ عدد الخلايا (2.8×10^3) خلية/مليلتر بعد (24) ساعة من الحضن فيما أزدادت قابلية بكتريا *L.plantarum* على تثبيط بكتريا *E. coli* O157:H7 عند زيادة مدة الحضن الى 48 ساعة عندما وصلت أعداد الخلايا الى الصفر ، في الوقت الذي بلغت فيه أعداد الخلايا لدى التنمية المفردة (معاملة السيطرة) (5×10^5 و 3×10^6) خلية/مليلتر مدتي الحضن (24 و 48) ساعة على التوالي.

مما تقدم يتضح أمتلاك بكتريا *L.plantarum*القدرة على تثبيط بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم ويعود ذلك الى قابليتها على انتاج العديد من المواد المثبطة ، وبهذا الخصوص فقد لاحظ (14) ان الأنواع التابعة لجنس *Lactobacillus* تنتج موادا" مثبطة وقاتلة لبكتريا *E. coli* O157:H7 ،وعزى ذلك التأثير الى انتاج الحوامض العضوية وخفض الأس الهيدروجيني .فيما أشار (15) الى وجود عوامل اخرى فضلا" عن خفض الأس الهيدروجيني الناتج عن الحوامض العضوية التي تنتجها هذه البكتريا تساهم في تثبيط بكتريا *E. coli* ، وتشمل تلك العوامل أنتاج البكتريوسينات ، بيروكسيد الهيدروجين و مركبات أيضية ذا الوزن الجزيئي الواطئ ،مثل: الداي أسيتيل، وثنائي أوكسيد الكاربون فضلا عن الأنزيمات.وتمتلك بكتريا *L.plantarum* تأثيرا تثبيطيا تجاه عدد من البكتريا غير المرغوب فيها في الأغذية مثل: بكتريا *E. coli*، و *Vibrio*، و *Staphylococcus aureus*، و *Salmonella* (16).

لوحظ من النتائج ايضا ان زيادة مدة الحضن أدت الى زيادة الفعالية التثبيطية لبكتريا *L.plantarum* وهذا يتفق مع ما وجده (17) عندما لاحظ أنخفاض الأعداد الحية لبكتريا *E. coli* بعد 24 ساعة من التنمية المشتركة، ووصولها الى الصفر بعد 36 ساعة من النمو المشترك .وما لاحظته (18) من تناقص واضح في أعداد بكتريا *E. coli* O157:H7 لدى التنميه المشتركة مع بكتريا *L.plantarum* .

التأثير التثبيطي للتوابل تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم :

بينت النتائج وجود فعالية تثبيطية للتوابل قيد الدراسة (الثوم، والقرنفل، و الفلفل الأسود) ، تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم ، أذ لوحظ حدوث أنخفاض في اعداد الخلايا الحية لبكتريا *E. coli* O157:H7 لدى معاملة اللحم الملقح بها بالتوابل المذكورة،وكان مسحوق الثوم المستعمل قد اعطى أعلى فعالية تثبيطية مقارنة بالتوابل الأخرى، وذلك عندما أدى الى خفض اعداد الخلايا الى (3×10^2) خلية /مليلتر عند مدة الحضن (24) ساعة فيما وصلت الى الصفر عند مدة الحضن (48) ساعة.اما مسحوق القرنفل والفلفل الأسود فقد كان تأثيرهما متقاربا عندما ادى استعمالهما الى خفض اعداد بكتريا *E. coli* O157:H7 الى (1.3×10^4 و 1.1×10^4) خلية/مليلتر على التوالي لمدة الحضن (24) ساعة، فيما وصلت فيه اعداد الخلايا عند مدة الحضن (48) ساعة الى (3.3×10^2 و 2×10^2) خلية/مليلتر على التوالي .في الوقت الذي بلغت فيه اعداد خلايا *E. coli* O157:H7 في معاملة السيطرة (عند التنمية لوحدها) (5×10^5 و 3×10^6) خلية/مليلتر مدتي الحضن (24 و 48) ساعة على التوالي.

تمتلك التوابل الفعالية التثبيطية تجاه الأحياء المجهرية ، ويعد الثوم من التوابل المهمة في هذا المجال ،اذ يكون له فعلا" تثبيطيا" واسعا" تجاه العديد من الممرضات المنتقلة عبر الغذاء الموجبة والسالبة لصبغة كرام (9) ، ويعود الفعل التثبيطي للثوم الى أحتوائه على المادة الفعالة المعروفة ب allicin (19) التي لها القابلية على التفاعل السريع مع المركبات البروتينية المحتوية على الثايول (thiol) داخل الخلية (9) .وبخصوص فعالية الفلفل الأسود فقد أشار (20) الى امتلاك الفلفل الأسود فعالية مضادة للمايكروبات المختلفة ، اما القرنفل فيمتلك ايضا فعالية تثبيطية تجاه البكتريا الموجبة والسالبة لصبغة كرام التي تدخل في تلف اللحوم (21).

ويعود الفعل التثبيطي للقرنفل الى الزيوت والأيثرات (لاسيما phenolether) الموجودة فيه التي تمتلك الصفة المضادة للمايكروبات (10 و 22).

التأثير التثبيطي لبكتريا *L.plantarum* والتوابل تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم :

درس التأثير التثبيطي لبكتريا *L.plantarum* والثوم، و *L.plantarum* والقرنفل، و *L.plantarum* والفلفل الأسود تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم ، وقد أظهرت النتائج وجود فعالية تثبيطية تأزرية واضحة تجاه نمو بكتريا *E. coli* O157:H7 لدى معاملة اللحم المفروم ببكتريا *L.plantarum* والثوم معا ، اذ لوحظ حدوث انخفاض كبير في اعداد الخلايا الحية لبكتريا *E. coli* O157:H7 عند التنمية مدة 24 ساعة التي بلغت (5×10^1) خلية/مليلتر مقارنة مع معاملة السيطرة التي بلغت اعدادها (5×10^5) خلية/مليلتر فيما وصلت اعداد الخلايا لبكتريا *E. coli* O157:H7 الى الصفر مدة الحضن 48 ساعة . أما لدى أستعمال بكتريا *L.plantarum* والقرنفل و *L.plantarum* والفلفل الأسود فقد كان هناك فعلا تثبيطيا تأزريا تجاه البكتريا قيد الأختبارولكن بمستوى اقل مما هو عليه لدى أستعمال الثوم ،اذ لوحظ أنخفاض أعداد الخلايا الحية لبكتريا *E. coli* O157:H7 الى (3.5×10^3 و 3×10^3) خلية/مليلتر مدة الحضن (24) ساعة لكل من القرنفل والفلفل الأسود مع بكتريا *L.plantarum* على التوالي .وأدت زيادة مدة الحضن الى 48 ساعة الى زيادة الفعالية التثبيطية التأزرية لبكتريا *L.plantarum* مع القرنفل والفلفل الأسود عندما وصلت أعداد الخلايا الحية لبكتريا *E. coli* O157:H7 الى الصفر ، في الوقت الذي بلغت فيه أعداد الخلايا الحية (3×10^6) خلية/مليلتر لمعاملة السيطرة شكل (3).

مما تقدم يتضح وجود تأثير تثبيطي تأزري ضد بكتريا *E. coli* O157:H7 يعود لتأثير بكتريا *L.plantarum* من جهة وتأثير التوابل من جهة أخرى ، ويلاحظ ايضا ان افضل فعل تثبيطي تأزري مدة الحضن 24 ساعة كان لدى استعمال الثوم مع بكتريا *L.plantarum* مقارنة بالتوابل الأخرى، ومقارنة بالفعالية التثبيطية لكل من *L.plantarum* والثوم لدى استعمالهما لوحدهما مدة الحضن نفسها ، وقد يعود ذلك الى دور الثوم في تحفيز نمو وفعالية بكتريا *L.plantarum* وانتاجها للمواد المثبطة ، اذ يساعد الثوم على تحفيز نمو بكتريا حامض اللاكتيك من خلال تجهيزها بالكاربوهيدرات التي تحتاج للنمو (23) ، كما ان اضافة التوابل الى اللحوم يحفز على انتاج حامض اللاكتيك من بوادئ بكتريا حامض اللاكتيك (9). ويعود تأثير التوابل في تحفيز انتاج حامض اللاكتيك الى المحتوى العالي للتوابل من المنغنيز الذي يعد من المحفزات القوية لتلك البوادئ (24).

أظهرت نتائج دراستنا الحالية أمتلاك بكتريا *L.plantarum* تأثيرا تثبيطيا واضحا تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 لدى معاملة اللحم المفروم بها ، كما أبدت التوابل قيد الدراسة ايضا تأثيرا تثبيطيا تجاه البكتريا المرضية قيد الأختبار، وكان الثوم قد أعطى أعلى تأثيرا تثبيطيا فيما تلاه القرنفل والفلفل الأسود وفقد كان تأثيرهما متشابها .ولدى خلط التوابل المذكورة مع بكتريا *L.plantarum* أبدت فعلا تثبيطيا تأزريا ضد بكتريا *E. coli* O157:H7 التي لم تنمو نهائيا لدى معاملتها بالخليط مدة 48 ساعة .ومن ذلك نستنتج أمكانية أستعمال خليط بكتريا *L.plantarum* والتوابل في السيطرة على نمو بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحوم لزيادة سلامتها وصلاحيتها للأستهلاك.

المصادر

1.Nigatu ,A. and Gashe ,B.A.(1994). Ethiop.Med.J.,32:223-229.

2. Woodhouse , S. (2002) . The new , more sinister face of a familiar pathogen: increasing antibiotic resistance and association with hemolytic syndrome. www.mlo.online.com.

3. Schimizu , K. ; Asahara , T. ; Nomoto , K. ; Tanaka , R. ; Ozawa , A. and Takeda , Y. (2003) . Microbial pathogenesis ., 35: 1 – 9 .

4. Durso, L.M.; Smith, D. and Hutkins, R.W. (2004). Appl. Environ. Microbiol., 70(11): 6466-6472.

5.Thomas,L.V.;Wimpenny,J.W.T. and Baker,G.C.(1997).J.Microbiology., 143:2575-2585.

6. Isolauri,E.; Sutas,Y. ; Kankaanpaa,P.; Arvilommi,H. and Salminen,S .(2001). *American J. of Clinic. Nutr*, 73 (2): 444S-450s,

7. Salvadori , B. ; Vesely , R. ; Ferrari , A. ; Canzi , E. , Casirachi , C. and Brighenti , F. (2001) . Microbiologica .,24 :23– 33 .

8. Delgado , A. ; Brito , D. ; Fevereiro , P. ; Peres , C. and Marques, J.F. (2001) . INRA. EDP. Science . Lait ., 81 : 203 – 215

9. Verluyten,J.; Leroy,F. and Vuyst,L. (2004) .Appll. and Environment. Microbiol., 70: 4807-4813.

10.المصلح، رشيد محجوب (1990) ألأحياء المجهرية في الأغذية . الطبعة الثانية ،مطابع التعليم العالي ،الموصل.

11.Hsieh, P.C.; Maw,J.L. and Dean,S.H.(2001) . Food Microbiol. 18:35-43.

12. Ogawa , M. ; Shimizu , K. ; Nomoto , K. ; Takahashi , M. ; Tanaka , R . ; Tanaka , T. ; Yamasaki , S. and Takeda , Y. (2001), *Infect and Immun* , 69(2) : 1101 – 1108.

13.Ibrahim, S,A. ; Dharmavaram,C.W. and Shahbazi,G.J.of Food Safety.V.2,6-8.

14. Ogawa , M. ; Shimizu , K. ; Nomoto , K. ; Tanaka , R. ; Yamasaki, S. ; Takeada , T. and Takeda , Y. (2001) .. J. Food . Microbiol ., 68 : 135 – 140 .

15. Brashears , M.M. ; Jaroni , D. and Trimble , J. (2003) .J. Food . Protection ., 66(3) : 355 – 363 .

16. Martin,A.M.(1996).Role of Lactic acid fermentation in Bioconvertion of wasts . In: Lactic Acid Bacteria :Current Advances in Metabolism ,Genetics and Application.Edited by Bozogulu,T.F. and Ray,B. Nato Series.

17. Sreekumar , O. and Hosono , A. (2000). J.Dairy Sci ., 83:931- 939 .

18. الدليمي،جيهان عبد الستار سلمان (2005) . استخدام بكتريا حامض اللاكتيك المعزولة من الأنسان و المصادر الغذائية في تثبيط نمو بعض البكتريا المسببة للاسهال، أطروحة دكتوراه . كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية ، العراق.

19. Harris, J. C., S. L. Cottrell, S. Plummer, and D. Lloyd. (2001). Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:282-286

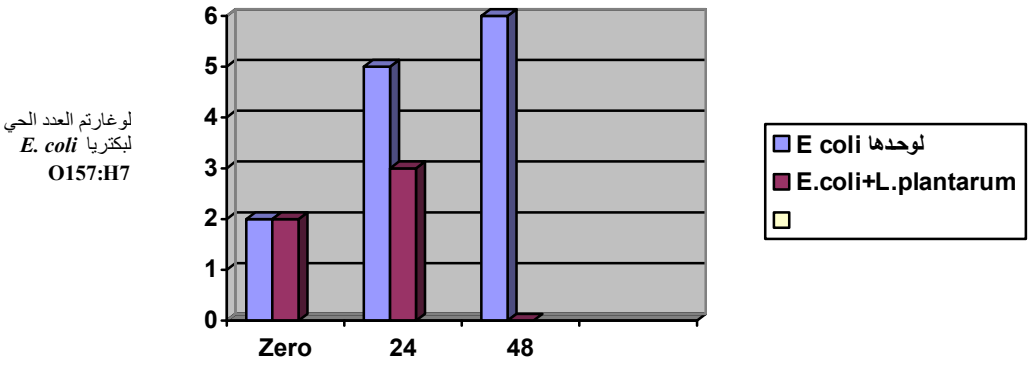
20. Dorman,H.J. and Deans ,S.G.(2000)..J.AppL.Microbiol. 88:308-316.

21. Thakara,M. (2004). Pharmacological screening of some medicinal plants as Antimicrobial and Food additives . Thesis, Faculaty of the Virginia Polytechnnc Institute and State University .

22. Kalemba,D. and Kunicka,A. (2003).Med.Chem.10:813-829.

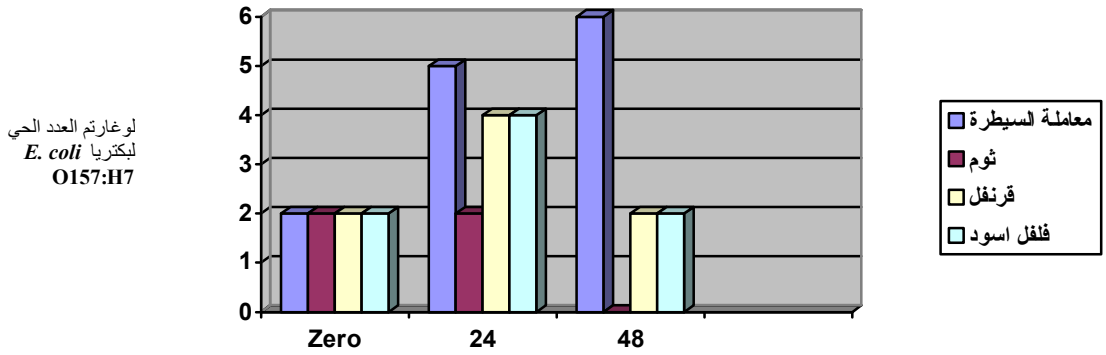
23. Paludan-Müller, C., H. H. Huss, and L. Gram.(1999). Int. J. Food Microbiol. 46:219-229.

24. Hagen, B. F., H. Næs, and A. L. Holck.(2000). Meat Sci. 55:161-168.



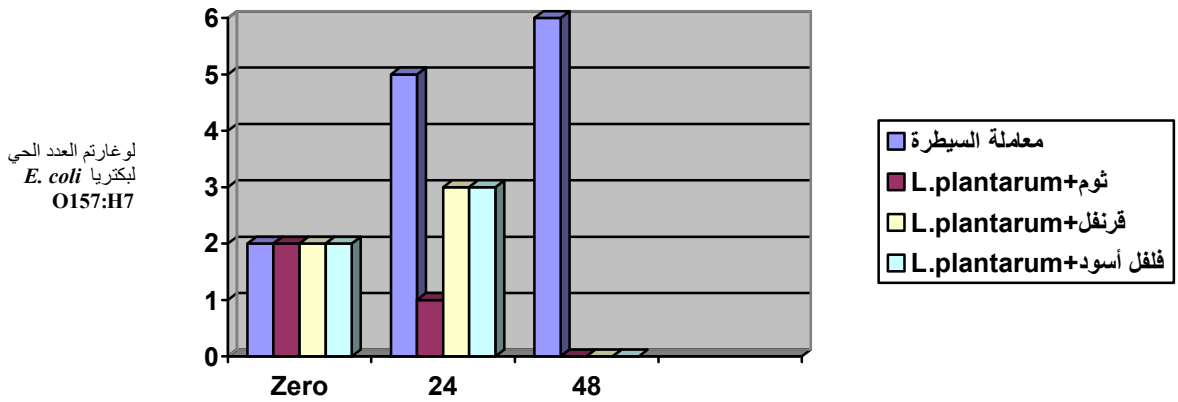
مدة الحضن (ساعة)

شكل (1) التأثير التثبيطي لبكتريا *L.plantarum* في نمو بكتريا *E. coli* O157:H7في اللحم المفروم .



مدة الحضن (ساعة)

شكل (2) التأثير التثبيطي للتوابل في نمو بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم



مدة الحضن (ساعة)

شكل (3) التأثير التثبيطي التأزري لبكتريا *L.plantarum* والتوابل تجاه بكتريا *E. coli* O157:H7 في اللحم المفروم.

The Inhibitory Effect of *Lactobacillus plantarum* and Some Spices in Growth of *E. coli* O157:H7 in Minced Beef

J. A. S. Salman , G. M. Khalil . and R. A. Abdul-Razaq
Department of Biology ,College of Science University - AL- Mustansiriya

Abstract

Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* was studied against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef , as well as the effect of some Spices (Garlic , Cloves and Black Pepper) was studied against this bacteria . Plate count method was used to estimate the viable cells of *E. coli* O157:H7 in the treated meat samples for incubation periods(0 , 24 and 48) h.

Results showed that *Lactobacillus plantarum* had inhibitory effect against *E. coli* O157:H7 , when reducing the number of cells after 24, 48 h., and reached to Zero after (24) h. As well as Spices in this study had inhibitory activity against *E. coli* O157:H7 .Garlic had the highest inhibitory effect compared with Cloves and Black Pepper.

The synergistic inhibitory effect of the combination of *Lactobacillus plantarum* and Spices (Garlic , Cloves and Black Pepper) separately were studied against *E. coli* O157:H7 in the minced beef using the same method of counting .

Results showed that the combination of *Lactobacillus plantarum* and spices had a synergistic inhibitory effect against *E. coli* O157:H7. The synergistic Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and garlic in (24)h. incubation period was higher than the effect of other spices.