الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا Listeria monocytogenes المعزولة من بعض اللحوم الطازجة من الاسواق المحلية لمدينة البصرة

Antibacterial activity of plant extracts against *Listeria monocytogenes* isolated from some fresh meat from local markets in the city of Basrah

إعداد

شهد عبد الكريم

Shahd Abdul Karim

سحر صبيح جورج

Saher Sobeih George

سوسن علي حميد الحلفي

Sawsan A. Al-Hilifi

قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة - جامعة البصرة – العراق

Doi: 10.21608/asajs.2024.349808

استلام البحث : ٢٢ / ٢ /٢٠٢٤

قبول النشـر : ١٥ / ٣ / ٢٠٢٤

عبد الكريم، شهد ة جورج ، سحر صبيح و الحلفي، سوسن علي حميد (٢٠٢٤). الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Listeria monocytogenes* المعزولة من بعض اللحوم الطازجة من الاسواق المحلية لمدينة البصرة. ***المجلة العربية للعلوم الزراعية***، المؤسسة العربية للتربية والعلوم والآداب، مصر، ٧(٢٢) إبريـل، ٢٥- ٤٨.

http://asajs.journals.ekb.eg

الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Listeria monocytogenes* المعزولة من بعض اللحوم الطازجة من الاسواق المحلية لمدينة البصرة

المستخلص:

Listeria monocytogenes هي أحد مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء وهي مسؤولة عن حوالي ١٦٠٠ مرض في الولايات المتحدة (الولايات المتحدة) وحوالي ٢٥٠٠ حالة بشرية مؤكدة في دول (الاتحاد الأوروبي). يتم تطبيق العديد من التقنيات ومضادات الميكروبات للسيطرة على وجود *L. monocytogenes* في الغذاء ومن بين هذه الأمور، يفضل المستهلكون استخدام مضادات الميكروبات الطبيعية. ويرجع ذلك إلى قدرتها على منع نمو مسببات الأمراض المنقولة بالغذاء وليس لديها تأثيرات جانبية مضرة بالصحة ومخاوف تتعلق بالسلامة. من بين مضادات الميكروبات الطبيعية، يتم استخدام المستخلصات النباتية لتثبيط نشاط بكتريا اللستيريا. كان الهدف من هذه الدراسة هو تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لمجموعة من المستخلصات النباتية ضد *L. monocytogenes* فقد تم عزل بكتريا *L. monocytogenes* من ٣١ عينة من اللحوم بواقع ٢٠ عينة من اللحم البقري الطازج و١١ عينة من لحم الدجاج الطازج وقيم التركيز المثبط الأدنى (MIC) للحساسية المضادة للميكروبات ضد اربعة من المضادات الحيوية(Penicillin , Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin). كذلك اختبرت الفعالية التثبيطيه للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا اذا امتلك المستخلص المائي لقشور الكيوي اعلى فعالية تثبيطيه بالمقارنة مع باقي المستخلصات النباتية المدروسة بقطر تثبيط بلغ 2omm عند تركيز الحد الادنى من التثبيط 1% ظهرت النتائج أن المستخلصات النباتية لها نشاط مثبط ضد *L. monocytogenes* وبالتالي يمكن أن تشمل هذه الدراسة استخدام هذه المستخلصات النباتية كمواد حافظة جديدة في التطبيقات المستقبلية لتقليل مخاطر بالأمراض المنقولة والتلوث في صناعة الأغذية من *L. monocytogenes*.

الكلمات المفتاحية: اللحوم الحمراء; المستخلصات النباتية; الفعالية التثبيطية Listeria; monocytogenes;

Abstract:

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen responsible for approximately 1,600 illnesses in the United States (US) and approximately 2,500 confirmed human cases in countries (European Union). Many techniques and

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

antimicrobials are applied to control the presence of L. monocytogenes in food and among these, consumers prefer to use natural antimicrobials. This is due to its ability to prevent the growth of foodborne pathogens and does not have harmful health side effects and safety concerns. Among natural antimicrobials, plant extracts are used to inhibit the activity of Listeria bacteria. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of a group of plant extracts against *L. monocytogenes. L. monocytogenes* bacteria were isolated from 31 meat samples, including 20 samples of fresh beef and 11 samples of fresh chicken meat, and the minimum inhibitory concentration (MIC) values were Antimicrobial sensitivity to four antibiotics (Penicillin, Erythromycin, Ciprofloxacin, Clindamycin). The inhibitory activity of plant extracts against bacteria was also tested. The aqueous extract of kiwi peels had the highest inhibitory activity compared to the rest of the studied plant extracts, with an inhibition diameter of 20 mm at the minimum inhibitory concentration 0.25% The results showed that the plant extracts have inhibitory activity against *L. monocytogenes* and therefore this study could include the use of these plant extracts as new preservatives in future applications to reduce the risk of vector-borne diseases and contamination in the food industry from *L. monocytogenes*

المقدمة Introduction

يعد تلوث الغذاء من المشاكل الخطيرة اذ حوالي ٢٠% من السكان العالم المعرضين للخطر بسبب تلوث مجموعة واسعة من الأطعمة، بما في ذلك اللحوم ومنتجاتها ومنتجات الألبان والطازجة ومشتقاتها بالميكروبات وبالأخص بتفشي داء الليستريات. *L. monocytogenes* لكون لهذه البكتريا القدرة على البقاء والنمو في الظروف البيئية القاسية مثل ارتفاع تركيز الأملاح وانخفاض درجة الحموضة ودرجة الحرارة المنخفضة. هذه الخاصية تزيد من احتمالية التلوث والنمو على المنتجات الغذائية والتي تشكل بعض تحديات العصر (Allen et al., 20115;

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

Rothrock et al., 2019; Bahrami et al.,2020) . وبالتالي، فإن وجود *L. monocytogenes* في الأطعمة لا يزال يؤخذ بعين الاعتبار كونه مشكلة كبيرة تتعلق بسلامة الأغذية في جميع أنحاء العالم (Pouillot et al.,2012; Fei et al., 2018). تعتبر مواد الحفظ والتعبئة والتغليف القابلة للتحلل الحيوي ومضادة الميكروبات ذات أهمية كبيرة في صناعة الأغذية وللمصنع والمنتج وللمستهلكين على حدا سواء ليس فقط كوسيلة تعزيز حفظ الأغذية وإطالة مدة صلاحيتها ولكن أيضًا لأغراض الحد من المشاكل البيئية الناجمة عن المواد الحافظة والمضادات الميكروبية المصنعة كيميائيا, وكمصادر امنه ورخيصة الثمن ,كما هناك حاجة إلى مضادات الميكروبات الطبيعية وغير السامة من أجل تعزيز الخصائص الصحية للمنتج، وتجنب سمية مضادات الميكروبات الأخرى. ولذلك، تم تطوير مواد مضادة للميكروبات ، وتمثل مضادات الميكروبات النباتية المجموعة الرئيسية من المواد الحافظة الطبيعية، التي تستهدف الخلايا الميكروبية, والتي تتواجد في أجزاء مختلفة من النباتات مثل البذور والثمار القشور والأوراق والجذور التي تكون غنية بمضادات الميكروبات النباتية مثل المركبات الفينولية و الفينولات البسيطة، الأحماض الفينولية، الأنثوسيانين، الفلافونويدات، الكينونات و الزيوت العطرية أو مركباتها النشطة، بديلاً حاليًا لـ حفظ الأغذية وإطالة مدة صلاحيتها (McClements et al.,2021; Favela-González et al., 2020) يتم تطبيق العديد من التقنيات ومضادات الميكروبات في السيطرة على*L. monocytogenes* ويفضل المستهلكون استخدام مضادات الميكروبات الطبيعية، خاصة عند مقارنتها بالمواد الحافظة الصناعية. ويرجع ذلك إلى قدرتها على منع نمو الميكروبات المنقولة بالغذاء بالإضافة الى كونها لا تثير مخاوف سلبية تتعلق بالسلامة (Araya-Cloutier et al., 2018; Guo et al., 2019; Xylia et al., 2018) ازداد الاهتمام بالآونة الاخيرة باستخدام المستخلصات النباتية والمركبات الفعالة المستخلصة منها على نطاق واسع كمضادات ميكروبية و كعوامل بديلة جديدة بيولوجية ضد السلالات الميكروبية ، وذلك بسبب خصوصية عملها الطبيعة القابلة للتحلل الحيوي وتطبيقاتها التجارية (Mejdoub et al., 2019; Benomari et al., 2018; Olszewska et al.,2020). ومع ذلك، هناك كمية كبيرة من هذه الأنواع من النباتات المستخلصات، ومركباتها النشطة لا تزال غير مستكشفة إلى حد كبير. ولذلك، هناك حاجة للتوسع معرفتنا بأنواع وجرعات المستخلصات النباتية المفيدة كمضادات للميكروبات في المكافحة لمسببات الأمراض الهامة المنقولة بالغذاء مثل *L. monocytogenes*. وكان الهدف من هذه الدراسة هو لتقييم نشاط لبعض المستخلصات النباتية كمضادات طبيعية لبكتريا *L. monocytogenes* والذي يعد

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

اكتشاف جديد واعد يمكن تطبيقه في صناعة الأغذية، مثل العلاجات بمضادات جديدة، مواد حافظة/مضادات ميكروبات أكثر فعالية أو لتعزيز تلك المستخدمة حاليًا، بالإضافة إلى تطوير مواد التعبئة والتغليف.

٢.المواد وطرائق العمل Materials and Methods

١.٢.عزل البكتريا Isolation of Bacteria

جمع ٣١عينة بواقع ٢٠عينة من لحم البقر الطازج و ١١عينة لحم الدجاج الطازج من مناطق محلية لمدينة البصرة خلال المدة من تشرين الأول - كانون الأول لعام ٢٠٢٢ ، نقلت العينات في حاوية مبردة إلى مختبر التقنية الحياتية التابع لقسم علوم الأغذية / كلية الزراعة جامعة البصرة للكشف عن تواجد بكتريا *Listeria monocytogenes*. أجريت عملية تنشيط للمستعمرات البكتيرية المنامات على وسط Palcam agar في ٩مل من وسط Thioglycolate broth حضر حسب توصيات الشركة المجهزة HIMEDIA, بوزن ٢٩.٢٥ غم من الوسط واذيب في لتر من الماء المقطر ثم سخن حتى الغليان لإذابة الوسط بالكامل ثم عقم ,استعمل هذا الوسط لتنشيط البكتريا عند ظروف لاهوائية و٩مل في وسط Fraser broth وحضنت عند درجة حرارة ٣٥- ٣٧مْ مْ لمدة ٢٤ ساعة بظروف لاهوائية باستخدام (الجار) بعدها أجريت عملية التخطيط على وسط Listeria chromogenic agar base المجهزة من شركة (CONDA). بأذبة ٧.٥ غم من الوسط في 100ماء مقطر معقم بعدها عقم و اضيف له ١٢٠٠مايكروليترمن Listeria Chromogenic Selective Supplement (Cat.6040) (مذاب في ٦ مل ماء مقطر معقم) اضيف الى الوسط بعد تبريده الى ٤٥مْ , ثم مزج جيدا وصب في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب ثم حضنت الاطباق بعد الزرع عند درجة حرارة ٣٥ مْ- ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة وحسب ما ذكر (Magalhães *et al.*, 2014) فان المستعمرات تظهر باللون الأزرق .

٢.١.٢. تنقية العزلات Purification of isolates

اخذت المستعمرات البكتيريا المنامات على وسط Listeria chromogenic agar base بواسطة الناقل المعدني Loop وخططت على وسط palcam agar وحضنت عند درجة حرارة ٣٥مْ - ٣٧مْ لمدة ٢٤ ساعة , وكررت هذه العملية اكثر من مرة للحصول على عزلات نقية .

٣.١.٢. الاختبارات التشخصية للبكتيريا *Listeria monocytogenes*

شخصت المستعمرات النامية والمعزولة على الأوساط الانتقائية (palcam agar وListeria chromogenic agar base) اعتمادا على صفاتـها المظهريـة

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

والتي شمـــلت شكـــل المستعمـــــرة ولونهـــا وحجمهـا وحافتهـــا (Magalhães *et al.*, 2014) .

٤.١.٢. الاختبارات الكيموحيوية

اجريت العديد من الاختبارات التشخيصية الكيموحيوية للبكتريا شملت (اختبار الكتاليز, الاوكسدين, استهلاك السترات, اختبار تحلل النشا, اختبار صبغة كرام, اختبار تحلل الدم)

٥.١.٢. التشخيص الجزئي لبكتريا *Listeria monocytogenes*

استعملة Genomic DNA minikit (Geneaid, Taiwan) حسب *توصيات الشركة المجهزة* لستخلاص DNA من بكتريا *Listeria monocytogenes* كقالب لتضخيم البريمرات Universal 16SrDNA للعزلات البكتريا الموجبة *Listeria monocytogenes و لتحديد السلالة* استعمل B 27 F 5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3' و U 1492R 5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3', اذ تم ضبط الدورة الأولية عند درجة حرارة ٩٢مْ لمدة دقيقتين ثم ٣٠ دورة عند درجة الحرارة ٩٤مْ لمدة ٣٠ ثانية و ٥١.٨مْ لمدة ٤٥ ثانية و ٧٢مْ لمدة ١.٥ و الدورة النهائية كانت عند درجة حرارة ٧٢مْ لمدة ٥ دقائق (Yang et al.,2024).

٥.١.٢. الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية ضد بكتريا *Listeria monocytogenes*

تم تقدير الفعالية التثبيطية للمضادات الحيوية باستخدام طريقة الأقراص اعتمادا على طريقة Rangel-López *et al.*, (2020) وتضمنت : نقل ٢-4 مستعمرات من بكتيريا *Listeria monocytogenes* إلى أنبوب إختبار يحوي 5مل من Fraser broth base وحضنت بدرجة 37 مْ لمدة 24 ساعات. خفف النمو الحاصل باستعمال وسط ماء البتون تمت مقارنة النمو في الأنبوب مع أنبوبة ماكفرلاند (0.5) القياسية ،, نشرت البكتيريا بواسطة الناشر الزجاجي على وسط Muller Hinton الصلب بطريقة النشر ، وتُركت الأطباق 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة لضمان إمتصاص الرطوبة، وُضعت أقراص المضادات الحيوية (Ciprofloxacin, Clindamycin, Erythromycin,Penicillin) بواقع أربعة أقراص في طبق قياس 100 ملي متر، ، والمسافة بين كل قرص وآخر 20 ملي متر من مركز القرص الأول إلى مركز القرص الآخر، حُضنت الأطباق في 37 مْ لمدة٢٤ ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثم قيست أقطار التثبيط باستعمال المسطرة المدرجة.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

٢.٢.تحضير المستخلصات النباتية Preparation of plants Extractions

١.٢.٢. المستخلص الكحولي

وزن ١٠٠غم من مسحوق كل نبات، واضيف اليه ٥٠٠مل الكحول الاثيلي ٩٨% مزج جيدا وترك لمدة ساعة في درجة حرارة المختبر ٢٥مْ بعدها رشح المحلول باستعمال اوراق ترشيح Whatman No.1 جمع الراشح و ركز الراشح بالمبخر الدوارRotary Vacuum Evaporator عند درجة حراة ٤٠مْ لتخلص من المذيب Kamal *et al.,*(2019) . بعدها جفف الراشح بدرجة حرارة المختبر . وضع في عبوات معتمة محكمة الغلق وحفظ في التجميد عند درجة الحرارة ١∓ ١٨ مْ لحين الاستعمال .

٢.٢.٢. المستخلص المائي

اتبعت الطريقة الموصوفة في Numman(2017) لتحضير المستخلصات المائية وذلك باذابة ٢٥غم من المسحوق المجفف لكل نموذج مع ٥٠٠مل من ماء مقطر ومزج الخليط لمدة ٣٠ دقيقة باستعمال جهاز المازج المغناطيسي ، رشحت المستخلصات بواسطة قمع بخنر Buechner funnel باستعمال اوراق ترشيح Whatman No.1 جمع الراشح و ركز بالمبخر الدوارVacuum Evaporator Rotary عند درجة حراة ٤٠مْ بعد ذلك صب الراشح في اطابق بتري وترك ليجف درجة حرارة المختبر و وضع في عبوات معتمة محكمة الغلق وحفظ في التجميد عند درجة الحرارة ١∓ ١٨ مْ لحين الاستعمال.

جدول (١) النباتات المستعملة في الدراسة

ت	الاسم العربي	الاسم الإنكليزي	الاسم العلمي
١	الكيوي	Kiwi	*Actinidia deliciosa*
٢	الباذنجان	Eggplant	*Solanum melongena*
٣	البطيخ الأصفر	Cantaloupe	*Cucumis melo*
٤	الخس	Lettuce	*Lactuca sativa*
٥	اللهانة البيضاء	White cabbage	*Brassica oleracea*
٦	اللهانة الحمراء	Red cabbage	*Brassica oleracea*
٧	الشوندر	Beetroot	*Beta vulgaris*
٨	الذرة	Corn	*Zea mays subsp*

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

3.2: تقدير المحتوى الكلي للفينولات Estimation of total phenol content

قدرت الفينولات الكلية في المستخلصات الكحولية والمائية للنباتات باستعمال طريقة Folin - Ciocalteu و الموضحة من قبل López et al., (2010) مع بعض التحويرات وذلك باذابة ٠.٥غم من المستخلصات النباتية في ٥ مل ماء مقطر بعدها اخذ ١مل من المستخلصات النباتية المذابة واضيف اليها ١مل من كاشف Folin - Ciocalteu وخلط جيدا وبعد مرور ٥ دقائق اضيف ٢مل (20%) Na2CO3 و ترك الخليط في مكان مظلم لمدة ساعة مع الرج المتقطع بعدها قيست الامتصاصية عند طول موجي ٧٦٠ نانومتر. وحسب الكمية الكلية للفينولات على اساس حامض الكالك ملغم\مل.

٤.٢. الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Listeria monocytogenes*

استعملت طريقة الحفر وحسب طريقة (Naji and Qaddoori ,2023) اذ تم تحضر وسط Muller Hinton حسب توصيات الشركة المجهزة OXOID ، بوزن ٣٨غم من الوسط واذيب في لتر من الماء المقطر , عقم الوسط عند درجة حرارة 121م لمدة ١٥ دقيقة ثم صب في أطباق بتري بمقدار ٢٠ - ٢٥ مليلتر وترك حتى يتصلب. بعد ذلك نشطت بكتريا *Listeria monocytogenes* في الأوساط السائلة الانتقائية (Fraser broth base) بدرجة حرارة 37 لمدة ٢٤ساعة ثم قورنت مع انابيب ماكفرلاند القياسية المحضرة من شركة Himedia أخذت القراءة بوساطة جهاز السبكتروفوتوميتر بطول موجي ٦٠٠ نانوميتر وتم مقارنة المعلق البكتيري*Listeria monocytogenes* مع قراءة ماكفرلاند أي ملاحظة العكارة فعند تساوي القراءتين فذلك يدل على إن أعداد البكتريا أصبحت $١٠^{٨}$ / مليلتر. ثم حضرت تراكيز المستخلصات النباتية باذابة ٠.٥ غم من كل نوع من انواع المستخلصات النباتية على حدة واكمل الحجم الى ٥مل ماء مقطر بعدها نقل ٠.١مليلتر من الوسط السائل الحاوي على بكتريا *Listeria monocytogenes* المرضية ونشرت بوساطة L.Shape وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ساعتين وثم ثقبت الأطباق بوساطة ثاقب فليني بقطر ٥ملم ووضع ٠.٠٥ مليلتر من المستخلصات النباتية في الحفر و نقلت الأطباق إلى الثلاجة لمدة ساعتين بعد ذلك نقلت للحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ١٨ ساعة وقيس قطر هالات التثبيط بوساطة مسطرة وبضمنها الحفرة.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

٣. النتائج والمناقشة

١.٣ . جمع العينات

جمعت العينات من لحم البقر الطازج المفروم و لحم الدجاج الطازج من مناطق مختلفة لمدينة البصرة وكما موضح في جدول (٢)

جدول (٢) تواجد بكتريا *Listeria monocytogenes* لمناطق مختلفة لمدينة البصرة

ت	المنطقة	نوع العينة	النتيجة
١	محيلة	لحم مفروم	+
٢	محيلة	لحم مفروم	-
٣	براضعية	لحم مفروم	+
٤	مهيجران	لحم مفروم	+
٥	مهيجران	لحم مفروم	+
٦	سراجي	لحم مفروم	+
٧	السراجي	لحم دجاج	+
٨	يوسفان	لحم مفروم	+
٩	يوسفان	لحم مفروم	+
١٠	يوسفان	لحم دجاج	-
١١	حمدان	لحم مفروم	-
١٢	حمدان	لحم مفروم	+
١٣	حمدان	لحم دجاج	+
١٤	العشار	لحم مفروم	-
١٥	العشار	لحم دجاج	+
١٦	العشار	لحم دجاج	-
١٧	العشار	لحم مفروم	-
١٨	العشار	لحم مفروم	+
١٩	البصرة القديمة	لحم مفروم	-
٢٠	البصرة القديمة	لحم دجاج	-
٢١	البصرة القديمة	لحم مفروم	+
٢٢	البصرة القديمة	لحم مفروم	+

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

٢٣	البصر القديمة	لحم دجاج	+
٢٤	البصرة القديمة	لحم دجاج	+
٢٥	البصرة القديمة	لحم دجاج	+
٢٦	المشراق	لحم مفروم	-
٢٧	المشراق	لحم دجاج	-
٢٨	كرمة علي	لحم مفروم	+
٢٩	كرمة علي	لحم مفروم	+
٣٠	كرمة علي	لحم دجاج	+

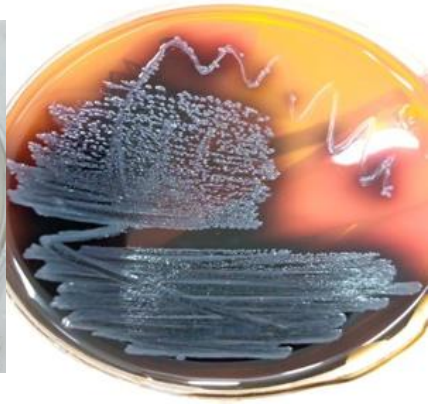
يلاحظ من الجدول (٢) تواجد بكتريا *Listeria monocytogenes* في عينات اللحم المفروم و لحم الدجاج لمناطق مختلفة لمدينة البصرة بنسب متفاوتة وقد يرجع السبب في هذا التفاوت الى مدى تلوث محلات الجزارة المتواجدة في المناطق المنتخبة في الدراسة اذ كان اعلى مستوى تلوث للحم المفروم و لحم الدجاج في منطقة البصرة القديمة و كرمة علي بينما وجد ان هناك تلوث ملحوظ في مناطق العشار و حمدان و محيلة و مهيجران و السراجي و يوسفان و البراضعية في حين لم يلاحظ أي تلوث في منطقة المشراق وفي دراسة قام بها Al-Ghanim et al.(2021) لمعرفة نسبة تلوث الأغذية المجمدة (اللحوم المفرومة و الأسماك و الدجاج) ببكتريا*Listeria monocytogenes* في محافظة البصرة وجدوا ان نسبة التلوث في اللحوم المفرومة اعلى من نسبة التلوث في لحم الدجاج ذلك بسبب صغر المساحة السطحية للحم المفروم و زيادة نسبة الرطوبة و تغلغل الاوكسجين فيه أو بسبب مكائن الفرم التي يصعب تنظيفها فعند تواجد بقايا من اللحم المفروم في الماكنة سوف تتوفر ظروف ملائمة لنمو الاحياء المجهرية و وبالتالي يحدث تلوث للحوم كما قد تتلوث لحوم الدواجن نتيجة التماس مع الفضلات و الجلد وهذا يتفق مع ما ذكره Altınbalık and Akbulut,(2022).

٢.٣. عزل و تشخيص بكتريا *Listeri monocytogenes*

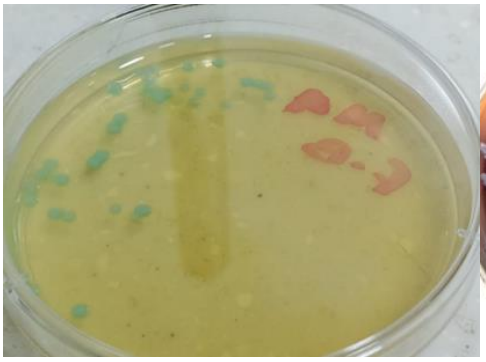
عزلت بكتريا الليستريا على مجموعة من الأوساط الانتقائية التشخيصية الخاصة وحسب الطريقة الموصوفة في Rapeanu *et al.*,(2008) وسط Fraser broth لتنشيط البكتريا في الظروف الهوائية وكذلك استعملت طريقة Jula et al.(2024) وسط Thioglycolate broth في الظروف اللاهوائية و لتشخيص البكتريا *Listeri monocytogenes* استعمل Faruk et al.(2023) وسط Palcam agar لوحظ ان حجم المستعمرات صغيرة دائرية الشكل ذات لون رصاصي ويتغير لون الوسط من الاحمر الى الاسود وذلك لان بكتريا *Listeri*

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

monocytogenes تحلل مادة Esculin تحليلاً مائياً و تحوله الى مادة 6,7- dihydroxycoumarine و التي تتفاعل مع Ferric Ammonium Citrate مما يؤدي الى اسوداد الوسط(Kaur and Balgir, 2021)و لتنقية البكتريا استعمل وسط Listeria chromogenic agar base و كان لون المستعمرات البكتيرية اخضر فيروزي محاطة بهالة شفافة (Zhao et al.2021).



شكل (١) بكتريا Listeri monocytogenes على وسط Palcam agar



شكل (٢) بكتريا *Listeri monocytogenes* على وسط Listeria chromogenic agar

٣.٣. الاختبارات الكيموحيوية

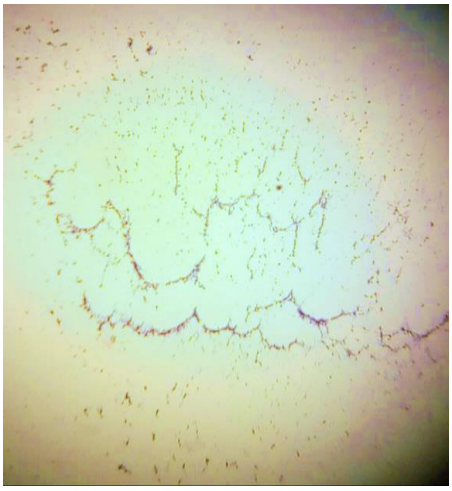
أجريت مجموعة من الاختبارات الكيموحيوية لغرض تشخيص البكتريا كما موضح في الجدول (٣)

جدول (٣) نتائج اختبار الكيموحيوية

الاختبارات الكيموحيوية	النتيجة
الكاتليز	+
الاوكسيديز	-
سترات	-
تصبيغ كرام	+
تحلل الدم	+
الحركة	+

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (٣) ان بكتريا *Listeri monocytogenes* موجبة للاختبار الكاتليز و سالبة لاختبار الاوكسيديز و السترات و وهذا يتفق مع ما ذكره Goudar *et al.*(2021). اذ تعد هذه البكتريا متحركة لاحتوائها على اسواط وعند اجراء عملية التصبيغ لوحظ انها موجبة لصبغة كرام كما في شكل (٣) تكون بشكل عصيات كبيرة وصغيرة ملتصقه مع بعضها البعض لوجود البروتين السطحي Act-A الذي يعمل على لصق البكتريا بالأخرى من جهة القطب المحتوي على البروتين Act-A وذلك بسبب التجاذب المغناطيسي الذي يعود الى اختلاف الشحنات الكهربائية في الخلايا الذكرية و الانثوية التي تكون متعاكسة في ترتيب الشحنات السطحية وبتالي تنجذب النهايات بعضها الى بعض (Alnasrawi and Al-Abbidee 2016) اما اختبار تحلل الدم الموضح في شكل (٤) يعرف بأنه من الاختبار التي تميز بكتريا *Listeri monocytogenes* عن أنواع الليستريا الأخرى التي ليس لها القدرة على تحلل الدم و ذلك لان بكتريا *Listeri monocytogenes* تحتوي على عامل محلل لدم و هو Listerolysin O و الذي يعتبر من جينات الضراوة في البكتريا وهذا ما ذكر Rouhi *et al.*(2024).



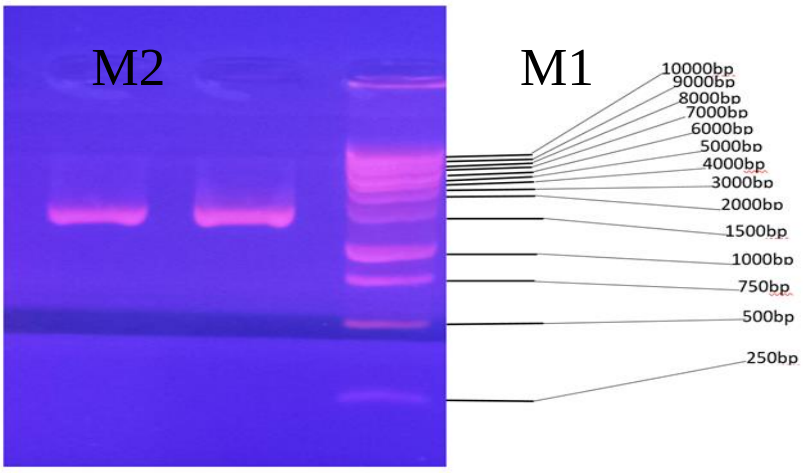
شكل (٣)
بكتريا Listeri monocytogenes تحت المجهر بعد تصبيغ كرام

شكل (٤)
اختبار تحلل الدم لبكتريا Listeri monocytogenes

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

٤.٣. التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيريا *Listeri monocytogenes* باستعمال تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

تم تأكيد السلالات لبكتريا*Listeri monocytogenes* عن طريق التشخيص الوراثي للسلالاتها عن طريق فحص الحامض النووي المستخلص من العزلتين (M1,M2) عن طريق الترحيل الكهربائي لهلام الاكارو ثم التعرض لتفاعل البوليمراز المتسلسل PCR لتضخيم universal 16SrDNA gene و قورن موقع الحزم على هلام الاكاروز ١٥٠٠bp مع سلم الحامض النووي كما هو مبين في شكل (٥) بعد ذلك تتم مقارنة التسلسل الجيني للسلالات sequencing مع التسلسل الجيني للسلالة المرجعية في Bank Gene باستعمال BLAST : https://www.ncbi.nlm.nih.gov ان طريقة sequencing اكثر دقة في تحديد البكتريا المرضية بالاعتماد على التشخيص الجيني اذ تبين ان العزلتين (M1,M2) هما *Listeria monocytogenes strain saswsh-1 Listeria*, *monocytogenes strain Saswsh-2* على التوالي . سجلت هتين السلالتين على انها عزلات محلية جديد في العراق _البصرة كسلالة جديدة وتم اختبارها في بنك الجينات .



شكل (٥) نتائج DNA المضاعف باستعمال تقنية PCR من البكتريا المعزولة من اللحم المفروم .M= سلم الحامض نووي(١٠٠٠٠ Molecular-weight bp size marker) بأحجام مثبته كل منها بعدد ازواج القواعد النيتروجينية (bp) على الجانب الأيمن من الشكل

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

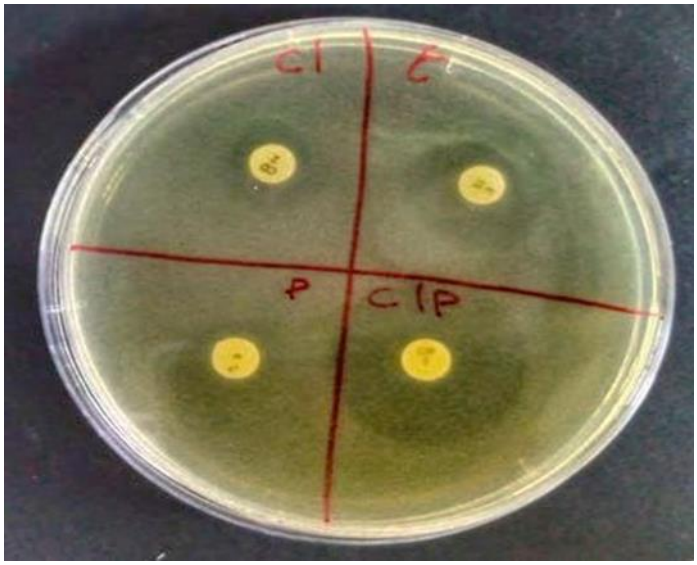
٥.٣ . حساسية بكتريا *Listeri monocytogenes* للمضادات الحيوية

اجري اختبار حساسية *Listeri monocytogenes* باستعمال اربع مضادات حياتية منتخبة في الدراسة اذ استعملت طريقة لصق الأقراص على وسط Muller Hinton agar تبعاً لمنظمة المختبرات السريرية القياسية Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) لتحديد مدى حساسية او مقاومة العزلات البكتريا للمضادات الحيوية. اذ قيس القطر التثبيطي وكما موضح في شكل (٦) اذ أظهرت النتائج المتحصل عليها ان للبكتريا حساسية عالية ضد المضادين الحيويين Ciprofloxacin و Erythromycin في حين وجد هناك مقاومة ضد المضادات Penicillin-G و Clindamycin وهذا يتفق مع الكثير من الدراسات منها Zakari and Sabala(2024) فقد لا حضوا ان بكتريا *Listeri monocytogenes* مقاومة للمضاد الحيوي Penicillin بنسبة70.83% في حين كانت حساسة تجاه المضاد الحيوي Ciprofloxacin بنسبة 79.17% و Erythromycin بنسبة 79.17% . بينما بين Kawacka et al.(2023) ان نسبة حساسية بكتريا *Listeri monocytogenes* للمضاد الحيوي Ciprofloxacin ٩٣.٥% في حين كان المقاومة للبكتريا *Listeri monocytogenes* ٠% و ذكر Saleh *et al*.(2024) ان مقاومة بكتريا *Listeri monocytogenes* للمضاد الحيوي Ciprofloxacin ٨.٣٣% في حين كانت حساسيتها اتجاه هذا المضاد الحيوي ٥٠%. المضادات الحيوية Penicillin و Clindamycin من المضادات الحيوية المقاومة للبكتريا *Listeri monocytogenes* (Mortazavi *et al*., 2024; Oliveira *et al*.,2018; George et al., 202) كما موضح في الجدول (٤) والشكل (٦)

جدول (٤) نتائج حساسية بكتريا *Listeri monocytogenes* للمضادات الحيوية

ت	المضادات الحيوية	قطر التثبيط (ملم)
١	Penicillin-G	١٢
٢	Erythromycin	٢٠
٣	Ciprofloxacin	٢٥
٤	Clindamycin	١٥

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855



شكل (٦) اقطار تثبيط بكتريا *Listeri monocytogenes* ضد المضادات الحيوية

٣.٦. فعالية المستخلصات النباتية ضد بكتريا *Listeri monocytogenes*

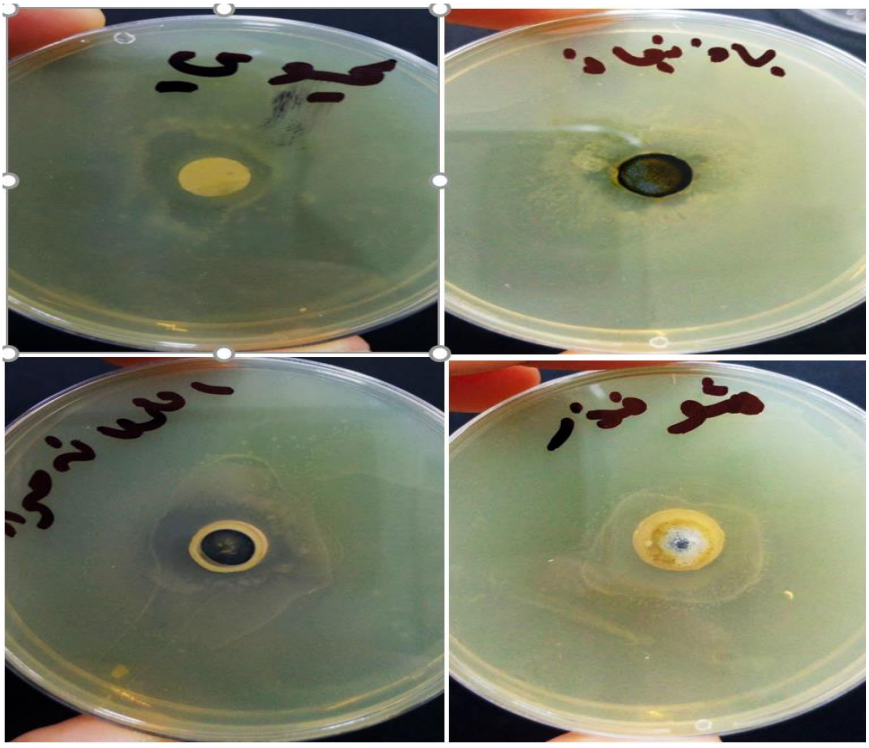
اظهرت نتائج اختبار الفعالية التثبيطية للمستخلصات النباتية المستعملة في الدراسة ضد بكتريا *Listeri monocytogenes* تأثير المستخلصات الكحولية (الايثانول ٩٨%) على نمو البكتريا *Listeri monocytogenes* بالمقارنة مع المستخلصات المائية . اذ بينت الدراسة ان المستخلص الكحولي لقشور الكيوي كان اكثر فعالية تثبيطيه ضد بكتريا *Listeri monocytogenes* بقطر تثبيطي ٢٠ملم مقارنة بالمستخلصات الأخرى وذلك لاحتوائها على المركبات الفعالة منها المركبات الفينولية و الفلافونويدات (Al-Ali et al., 2021; AL-Hilifi et al., 2020; Saewan et al.,2020) وهذا يتفق مع ما ذكره Siddique *et al.* (2021) في حين بلغت الفعالية التثبيطية لمستخلص قشور الباذنجان ضد البكتريا 13ملم وقد يرجع ذلك لاحتوائه على نسبة كبيرة من المركبات الفينولية و الانثوسيانينات و الفلافونيدات مقارنة بمستخلص الشوندر الذي ليس له فعالية تثبيطية ضد بكتريا *Listeri monocytogenes* و هذا يتفق مع Aboelhaggag and Abo-Zaid ,2023 ; Kumar et al., 2021; 2019 .(Omogbai and Omoregie) بينما بلغ القطر التثبيطي لمستخلص الهانة الحمراء ضد البكتريا ١٦ ملم وذلك

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

لاحتوائها على صبغة الأنثوسيانين و التي لها دور فعال كمضادات ميكروبية وهذا ما ذكره(2015) .Demirdöven et al.

جدول (٥) الأقطار التثبيط للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Listeria monocytogenes*

ت	المستخلصات النباتية	قطر التثبيط (ملم)
١	الكيوي	20
٢	الباذنجان	13
٣	الهانة الحمراء	16
٤	الشو ندر	٠

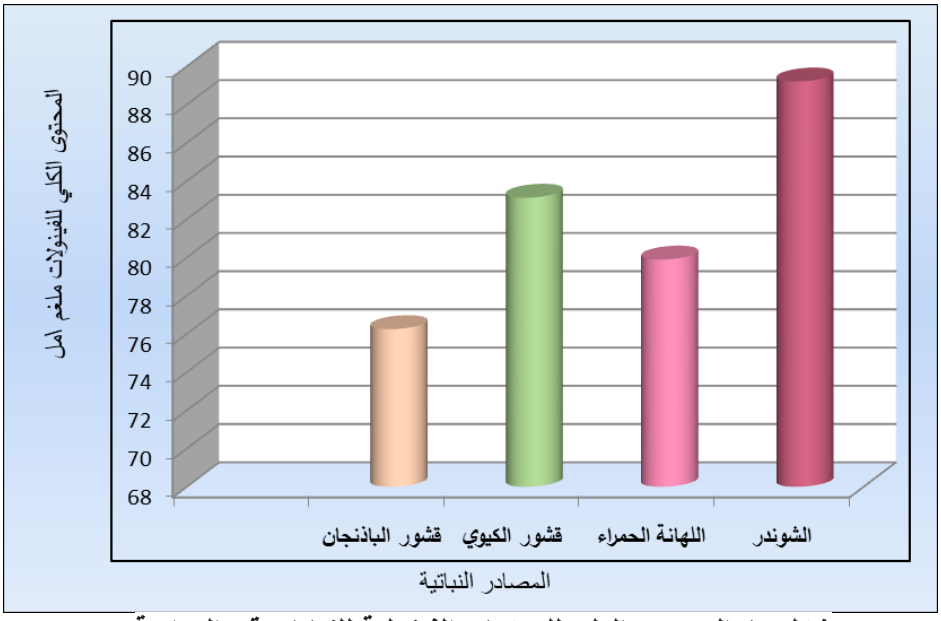


شكل (٧) الأقطار التثبيطية للمستخلصات النباتية ضد بكتريا *Listeria monocytogenes*

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

٧.٣. المحتوى الكلي للفينولات Total phenolics

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (٨) وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) بين المستخلصات الكحولية في محتوى المركبات الفينولية لمجموعة الخضروات إذ بلغت كمية الفينولات في المستخلص الكحولي للشوندر ٨٩.٢١ملغGAE/مل ، أما في قشور الكيوي فكانت نسبة المركبات الفينولية اقل ٨٣.١٣ملغGAE/مل، في حين كان اقل محتوى للمركبات الفينولية في قشور الباذنجان وهي ٧٦.٢٥ ملغGAE/مل. وان سبب هذا الاختلاف في كمية المركبات الفينولية بين المستخلصات النباتية قد يعود الى طبيعة المركبات المفصولة والاجزاء النباتية المستعملة والى قطبية المذيب المستعمل في الاستخلاص.



شكل (٨)المحتوى الكلي للمركبات الفينولية للنباتات قيد الدراسة

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

References

1- Allen, K.; Wałecka-Zacharska, E.; Kosek-Paszkowska, K.; Devlieghere, F.; Van Meervenne, E.; Osek, J.; Wieczorek,K.; Bania,J. Listeria monocytogenes–Anexaminationoffoodchainfactorspotentiallycontributing to antimicrobial resistance. Food Microbiol. 2015, 54, 178–189.

2- Araya-Cloutier, C.; Vincken, J.-P.; van Ederen, R.; den Besten, H.M.W.; Gruppen, H. Rapid membrane permeabilization of Listeria monocytogenes and Escherichia coli induced by antibacterial prenylated phenolic compounds from legumes. Food Chem. 2018, 240, 147–155.

3- Bahrami, A.; Baboli, Z.M.; Schimmel, K.; Jafari, S.M.; Williams, L. E ciency of novel processing technologies for the control of Listeria monocytogenes in food products. Trends Food Sci. Technol. 2020, 96, 61–78.

4- Benomari, F.Z.; Andreu, V.; Kotarba, J.; Dib, M.A.; Bertrand, C.; Muselli, A.; Costa, J.; Djabou, N. Essential oils from Algerian species of Mentha as new bio-control agents against phytopathogen strains. Environ. Sci. Pollut. Res. 2018, 25, 29889–29900.

5- Favela-González, K.M.; Hernández-Almanza, A.Y.; De la Fuente-Salcido, N.M. The value of bioactive compounds of cruciferous vegetables (Brassica) as antimicrobials and antioxidants: A review. J. Food Biochem. 2020, 44, e13414.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

6- Borderías, A.JSánchez-Alonso, J. and Pérez-Mateos, M. (2005). New application of fibers in foods: Addition to fishery products. *Trends Food Sci.Tech*., 16: 458-465.
7- Fei, P.; Ali, M.A.; Gong, S.; Sun, Q.; Bi, X.; Liu, S.; Guo, L. Antimicrobial activity and mechanism of action of olive oil polyphenols extract against Cronobacter sakazakii. Food Control 2018, 94, 289–294.
8- Guo, L.; Sun, Q.; Gong, S.; Bi, X.; Jiang, W.; Xue, W.; Fei, P. Antimicrobial activity and action approach of the olive oil polyphenol extract against Listeria monocytogenes. Front. Microbiol. 2019, 10, 1586 .
9- McClements, D.J.; Das, A.K.; Dhar, P.; Nanda, P.K.; Chatterjee, N. Nanoemulsion-based technologies for delivering natural plant-based antimicrobials in foods. Front. Sustain. Food Syst. 2021, 5, 643208.
10- Mejdoub, K.; Benomari, F.Z.; Djabou, N.; Dib, M.A.; GaouarBenyelles, N.; Costa, J.; Muselli, A. Antifungal and insecticidal activities of essential oils of four Mentha species. Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod. 2019, 14, e64165.
11- Olszewska, M.A.; G˛ edas, A.; Simões, M. Antimicrobial polyphenol-rich extracts: Applications and limitations in the food industry. Food Res. Int. 2020, 134, 109214.
12- Pouillot, R.; Hoelzer, K.; Jackson, K.A.; Henao, O.L.; Silk, B.J. Relative risk of listeriosis in Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet) sites

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

according to age, pregnancy, and ethnicity. Clin. Infect. Dis. 2012, 54, S405–S410.

13- Rothrock, M.J., Jr.; Micciche, A.C.; Bodie, A.R.; Ricke, S.C. *Listeria occurrence* and potential control strategies in alternative and conventional poultry processing and retail. Front. Sustain. Food Syst. 2019, 3, 33.

14- Xylia, P.; Chrysargyris, A.; Botsaris, G.; Tzortzakis, N. Mint and pomegranate extracts/oils as antibacterial agents against Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes on shredded carrots. J. Food Safety 2018, 38, e12423.14-Das, A. (2018). Advances in Chia seed research. Adv. *Biotechnol. Microbial*., 5: 5-7.

15- Magalhães, R., Mena, C., Ferreira, V., Almeida, G., Silva, J., & Teixeira, P.

16- (2014). Traditional methods for isolation of Listeria monocytogenes. Listeria

17- monocytogenes: Methods and Protocols, 15-30.

18- Rangel-López, L., Zaragoza-Bastida, A., Valladares-Carranza, B., Peláez- Acero, A., Sosa-Gutiérrez, C. G., Hetta, H. F., & Rivero-Perez, N. (2020). In vitro antibacterial potential of Salix babylonica extract against bacteria that affect Oncorhynchus mykiss and Oreochromis spp. Animals10(8), 1340.

19- Kamal, A. M., Taha, M. S., & Mousa, A. M. (2019). The radioprotective and

20- anticancer effects of banana peels extract on male mice. J. Food Nutr Res, 7, 827-835.

ISSN: 2537-0804 **eISSN: 2537- 0855**

21- Numman, I. (2017). Study of Lectins extract from Reseda odorta L andPeel eggplant. Kirkuk University Journal-Scientific Studies, 12(1), 447-456

22- Naji, S. A., & Qaddoori, H. T. (2023). Effects of Plant Extracts on Bacterial Isolates from Infections of the Female Genital Tract. Proceedings of the Pakistan Academy of Sciences: B. Life and Environmental Sciences, 60(2), 233-242.

23- Altınbalık, M. T., & Akbulut, Ö. F. (2022). The Effect of Sloping the Grinder Body of the Meat-Mincer Machines on the Reduction of Microorganism and Chemical Residuals after Cleaning-A Newly Design

24- Kaur, T., & Balgir, P. P. (2021). Listeriosis in Animals: Prevalence and Detection. Advances in Animal Disease Diagnosis, 147-167.

25- Zhao, L., Li, J. Q., Zhang, J., She, Z. Y., & Qi, Y. (2021). Evaluation quantitative detection of *Listeria monocytogenes* by plate method.

26- Goudar, V., Kanthesh, B. M., & Prasad, N. (2021). Isolation and identification of Listeria monocytogenes in Bangalore City from various food samples. Biomedical and Pharmacology Journal, 14(4), 2271-2276.

27- Alnasrawi ,H. A. A., and Al-Abbidee, H. O. (2016). Isolation and Identification of Listeria. monocytogenes From Human and Animal in Al-Qadissiya Province. Al-Qadisiyah Journal of Pure Science, 21(2).

28- Rouhi, A., Falah, F., Azghandi, M., Behbahani, B. A., Mortazavi, S. A., Tabatabaei-Yazdi, F., & Vasiee, A.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

(2024). Investigating the effect of Lactiplantibacillus plantarum TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115. LWT, 191, 115669.

29- Kawacka, I., Pietrzak, B., Schmidt, M., & Olejnik-Schmidt, A. (2023). Listeria monocytogenes Isolates from Meat Products and Processing Environment in Poland Are Sensitive to Commonly Used Antibiotics, with Rare Cases of Reduced Sensitivity to Ciprofloxacin. Life, 13(3), 821.

30- Mortazavi, Z. F., Islami, M. R., & Khaleghi, M. (2024). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of 4-Benzylidene-2-methyl-oxazoline-5-one against Pathogen Bacteria. Journal of Genetic Resources, 9-19.

31- Saleh, S. O., Hussien, A. A., Youseef, A. G., Younis, W. K., & Mubarak, A. G. (2024). Prevalence, antibiotic resistance, and phylogenetic analysis of *Listeria monocytogenes* isolated from various sources in Egypt: fish, vegetables, and humans. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 38(1), 15-27.

32- Zakaria, A. I., & Sabala, R. F. (2024). Potential public health hazards related to consumption of poultry contaminated with antibiotic *resistant Listeria monocytogenes* in Egypt. BMC microbiology, 24(1), 41.

33- Oliveira, T. S., Varjao, L. M., da Silva, L. N. N., Pereira, R. D. C. L., Hofer, E., Vallim, D. C., & de Castro Almeida, R. C. (2018). *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: Occurrence, genetic relationship among

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. Food control, 88, 131-138.

34- Yang, X., Peng, Z., He, M., Li, Z., Fu, G., Li, S., & Zhang, J. (2024). Screening, probiotic properties, and inhibition mechanism of a Lactobacillus antagonistic to *Listeria monocytogenes*. Science of The Total Environment, 906, 167587.

35- 31- Jula, C., Buechner-Maxwell, V., Southard, T., & LeCuyer, T. (2024). *Listeria monocytogenes* encephalitis in a donkey foal. Equine Veterinary Education, 36(3), e79-e84.

36- Al-Ghanim, A. M., & Abbas, B. A. (2021, May). Detection of *Listeria monocytogenes* in frozen food using a specific inlB virulence gene. In Journal of Physics: Conference Series (Vol. 1879, No. 2, p. 022011). IOP Publishing.

37- Faruk, M. O., Ema, F. A., Islam, M. A., & Khatun, M. M. (2023). Prevalence, molecular detection and antimicrobial susceptibility *of Listeria monocytogenes* isolated from milk, poultry meat and meat products. Food Research, 7(5), 308-317.

38- Kumar, N.; Pratibha; Neeraj; Petkoska, A.T.; AL-Hilifi, S.A.; Fawole, O.A. Effect of Chitosan–Pullulan Composite Edible Coating Functionalized with Pomegranate Peel Extract on the Shelf Life of Mango (Mangifera indica). Coatings 2021, 11, 764. https://doi.org/10.3390/coatings11070764.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855

39- Al-Ali, R.M., Al-Hilifi, S.A., and Rashed, M.M.A.(2021). Fabrication, characterization, and anti-free radical performance of edible packaging-chitosan film synthesized from shrimp shell incorporated with ginger essential oil. Journal of Food Measurement and Characterization, 8:9-16. https://doi.org/10.1007/s11694-021-00875-0.

40- Al-Hilifi, S.A.; Al-Ali, R.M.; Petkoska, A.T. Ginger Essential Oil as an Active Addition to Composite Chitosan Films: Development and Characterization. Gels 2022, 8, 327. https://doi.org/10.3390/gels8060327.

41- A. Saewan, A., Ali, R. M., George, S. and Mohammed, L.(2020). Study the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Tamarind (*Tamarindus indica L.)* Pulp and Seed. Syrian Journal of Agricultural Research – SJAR 7(2): 142-153.

42- George, S., Saewan, S.A. and Karomy, F.S.(2020). Study the effect of extracted vegetable oils and antibiotics in inhibiting different types of pathogenic bacteria. The 3rd International Conference of {Fmvironrncntal and Agricultural Status in the Micidte East) 14 - 16 July 2020, Cairo-Egypt.

ISSN: 2537-0804 eISSN: 2537- 0855