



# 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 النشر: ١٥ / ٣ / ٢٠٢٤

عبد الكريم، شهدة 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)  
إبريل، 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 مضرّة 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 و ١١ 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 التثبيطية للمستخلصات النباتية تجاه البكتريا اذا امتلك المستخلص المائي لقشور الكيوي اعلى فعالية تثبيطية بالمقارنة مع باقي المستخلصات النباتية المدروسة بقطر تثبيط بلغ 20mm عند تركيز الحد الأدنى 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 الأمراض 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

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 بنقشي 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;

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 ومضادات الميكروبات ذات أهمية كبيرة في صناعة الأغذية وللمصنع والمنتج وللمستهلكين على حد سواء ليس فقط كوسيلة تعزيز حفظ الأغذية وإطالة مدة صلاحيتها ولكن أيضاً لأغراض الحد من المشاكل البيئية الناجمة عن المواد الحافظة والمضادات الميكروبية المصنعة كيميائياً. وكصادر آمنه 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 والقشور 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 حالياً لحفظ 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 إلى كونها لا تثير مخاوف سلبية تتعلق بالسلامة (Araya-Cloutier et al., 2018; Guo et al., 2019; Xylia et al., 2018). الأخيرة باستخدام المستخلصات النباتية والمركبات الفعالة المستخلصة منها على نطاق واسع كمضادات ميكروبية و كعوامل بديلة جديدة بيولوجية ضد السلالات الميكروبية، وذلك بسبب خصوصية عملها الطبيعية 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 مكافحة 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

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 ٣١ عينة بواقع ٢٠ عينة من لحم البقر الطازج و ١١ عينة 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 و ٩مل في وسط *Fraser broth* وحضنت عند درجة حرارة ٣٥-٣٧م 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 100م ماء مقطر معقم بعدها عقم و اضيف له ١٢٠٠ مايكروليتر من *Listeria Chromogenic Selective Supplement (Cat.6040)* (مذاب في ٦ مل ماء مقطر معقم) اضيف الى الوسط بعد تبريده الى ٤٥م , ثم مزج جيدا وصب في اطباق بتري معقمة وترك ليتصلب ثم حضنت الاطباق بعد الزرع عند درجة حرارة ٣٥م - ٣٧م 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 البكتيرية المنامات على وسط *Listeria chromogenic agar base* بواسطة الناقل المعدني *Loop* وخطت على وسط *palcam agar* وحضنت عند درجة حرارة ٣٥م - ٣٧م لمدة ٢٤ ساعة , وكررت هذه العملية اكثر من مرة للحصول على عزلات نقية .

### ٣.١.٢. الاختبارات التشخيصية للبكتريا **Listeria monocytogenes**

شخصت المستعمرات النامية والمعزولة على الأوساط الانتقائية (*palcam agar* و *Listeria chromogenic agar base*) اعتمادا على صفاتها المظهرية

والتي شملت شكل المستعمرة ولونها وحجمها وحافتها (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 الجزيئي لبكتريا *Listeria monocytogenes*

استعملت Genomic DNA minikit (Geneaid, Taiwan) حسب توصيات الشركة المجهزة لاستخلاص DNA من بكتريا *Listeria monocytogenes* كقالب لتضخيم الريميرات Universal 16SrDNA للعزلات البكتريا الموجبة *Listeria monocytogenes* ولتحديد السلالة استعمل B 27 F U 1492R 5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3' و 5'-GGTTACCT TGTTACGACTT-3', اذ تم ضبط الدورة الأولية عند درجة حرارة ٩٢م لمدة دقيقتين ثم ٣٠ دورة عند درجة الحرارة ٩٤م لمدة ٣٠ ثانية و ١.٨م لمدة ٤٥ ثانية و ٧٢م لمدة ١.٥ و الدورة النهائية كانت عند درجة حرارة ٧٢م 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 اختبار يحوي 5مل من Fraser broth base وحضنت بدرجة 37 م 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 ، وثُركت 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 م لمدة ٢٤ ساعة لجميع أنواع المضادات الحيوية، ثم قيست أقطار التثبيط باستعمال المسطرة المدرجة.

## ٢.٢. تحضير المستخلصات النباتية

### ١.٢.٢. المستخلص الكحولي

وزن ١٠٠غم من مسحوق كل نبات، واضيف اليه ٥٠٠مل الكحول الايثيلي ٩٨% مزج جيدا وترك لمدة ساعة في درجة حرارة المختبر ٢٥م بعدها رشح المحلول باستعمال اوراق ترشيح Whatman No.1 جمع الراشح وركز الراشح بالمبخر الدور Rotary Vacuum Evaporator عند درجة حراة ٤٠م 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 ١٨-°م 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 ٥٠٠م 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 وركز بالمبخر الدور Rotary Vacuum Evaporator عند درجة حراة ٤٠م بعد ذلك صب الراشح في اطابق بتري وترك ليحف درجة حرارة المختبر و وضع في عبوات معتمة محكمة الغلق وحفظ في التجميد عند درجة الحرارة ١٨-°م لحين الاستعمال.

### جدول (١) النباتات المستعملة في الدراسة

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

### 3.2: تقدير المحتوى الكلي للفينولات Estimation of total phenol content

قدرت الفينولات الكلية في المستخلصات الكحولية والمائية للنباتات باستعمال طريقة Ciocalteu - Folin و الموضحة من قبل López et al., (2010) مع بعض التحويرات وذلك بإذابة ٠.٥ غم من المستخلصات النباتية في ٥ مل ماء مقطر بعدها اخذ ١ مل من المستخلصات النباتية المذابة و اضيف اليها ١ مل من كاشف Ciocalteu - Folin و خلط جيدا وبعد مرور ٥ دقائق اضيف ٢ مل (20%)  $Na_2CO_3$  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 لمغم/مل.

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

استعملت طريقة الحفر وحسب طريقة (Naji and Qaddoori, 2023) اذ تم تحضير وسط Muller Hinton حسب توصيات الشركة المجهزة OXOID ، بوزن ٣٨ غم من الوسط واذيب في لتر من الماء المقطر ، عقم الوسط عند درجة حرارة 121 م 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 ٢٤ ساعة 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  $10^8$  / مليلتر. ثم حضرت تراكيز المستخلصات النباتية بإذابة ٠.٥ غم من كل نوع من انواع المستخلصات النباتية على حدة و اكمل الحجم الى ٥ مل ماء مقطر بعدها نقل ٠.١ مليلتر من الوسط السائل الحاوي على بكتريا *Listeria monocytogenes* المرضية ونشرت بوساطة L.Shape وحضنت الأطباق بدرجة حرارة ٣٧ م لمدة ساعتين و تم ثقب الأطباق بوساطة ثاقب فليني بقطر ٥ ملم 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.

### 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	مهبجران	لحم مفروم	+
٥	مهبجران	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	+

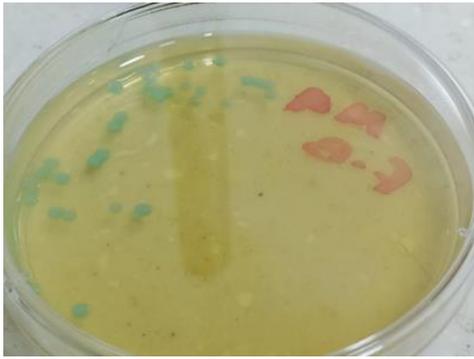
+	لحم دجاج	البصر القديمة	٢٣
+	لحم دجاج	البصرة القديمة	٢٤
+	لحم دجاج	البصرة القديمة	٢٥
-	لحم مفروم	المشراق	٢٦
-	لحم دجاج	المشراق	٢٧
+	لحم مفروم	كرمة علي	٢٨
+	لحم مفروم	كرمة علي	٢٩
+	لحم دجاج	كرمة علي	٣٠

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 للحوم 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 للحوم المفروم و زيادة نسبة الرطوبة و تغلغل الاوكسجين فيه أو بسبب مكانن 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 Altinbalik and Akbulut,(2022).

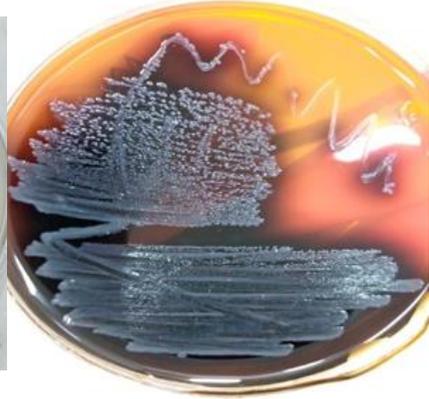
### ٢.٣. عزل و تشخيص بكتريا *Listeri monocytogenes*

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*

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



شكل (١) بكتريا *Listeria monocytogenes* على وسط *Palcam agar*

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

جدول (٣) نتائج اختبار الكيموحيوية

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

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 ملتصقة 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 وبالتالي 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 (٤)

اختبار تحلل الدم لبكتريا *Listeri monocytogenes*



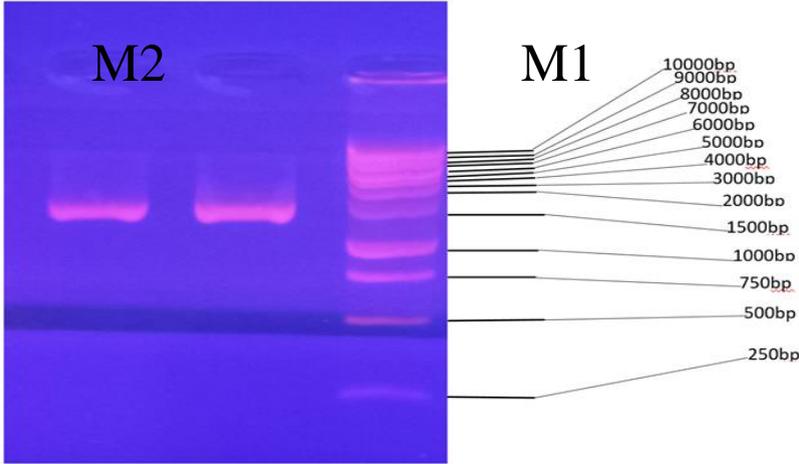
شكل (٣)

بكتريا *Listeri monocytogenes* تحت المجهر بعد تصبيغ كرام

### ٤.٣. التشخيص الجزيئي للعزلة البكتيرية *Listeri monocytogenes* باستعمال

#### تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

تم تأكيد السلالات لبكتيريا *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* و *Listeria monocytogenes strain Saswsh-2* على انها عزلات محلية جديد في العراق\_ البصرة كسلالة جديدة وتم اختبارها في بنك الجينات .

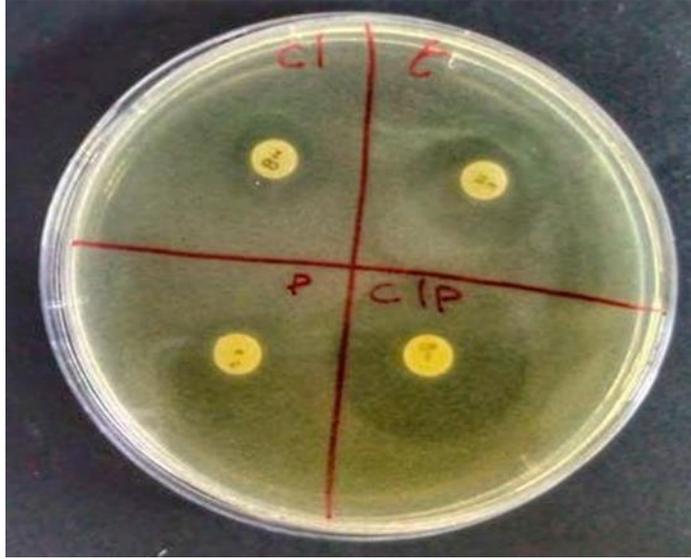


شكل (٥) نتائج DNA المضاعف باستعمال تقنية PCR من البكتريا المعزولة من اللحم المفروم M=سلم الحامض نووي (١٠٠٠٠ bp Molecular-weight size marker) بأحجام مثبته كل منها بعدد ازواج القواعد النيتروجينية (bp) على الجانب الأيمن من الشكل

٥.٣ . حساسية بكتريا *Listeri monocytogenes* للمضادات الحيوية  
 اجري اختبار حساسية *Listeri monocytogenes* باستعمال اربع  
 مضادات حيائية 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 بنسبة 70.83%  
 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 (مم)
١	Penicillin-G	١٢
٢	Erythromycin	٢٠
٣	Ciprofloxacin	٢٥
٤	Clindamycin	١٥



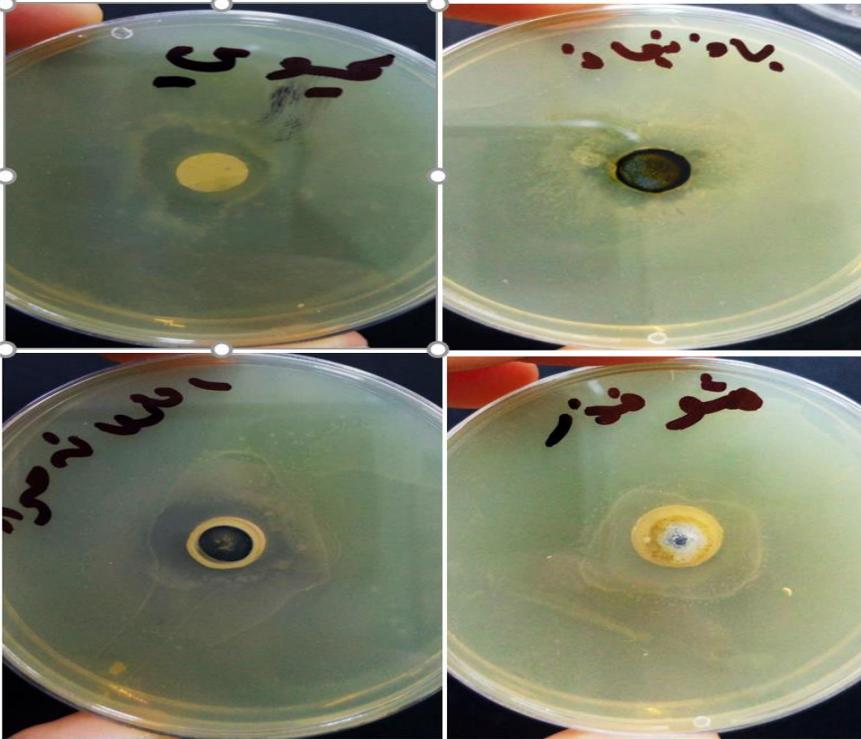
شكل (٦) اقطار تثبيط بكتريا *Listeri monocytogenes* ضد المضادات الحيوية

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 ٢٠ ملم مقارنة بالمستخلصات الأخرى وذلك لاحتوائها على المركبات الفعالة منها المركبات الفينولية و الفلافونويدات (Al-Ali et al., 2021; AL-Hilifi et al., 2020; Siddique et al. (2021) Saewan et al., 2020) وهذا يتفق مع ما ذكره (Siddique et al. (2021) في حين بلغت الفعالية التثبيطية لمستخلص قشور الباذنجان ضد البكتريا 13 ملم 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* وهذا يتفق مع (Kumar et al., 2021; 2019; Omogbai and Omoregie) Aboelhaggag and Abo-Zaid, 2023. بينما بلغ القطر التثبيطي لمستخلص الهانة الحمراء ضد البكتريا ١٦ ملم وذلك

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

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

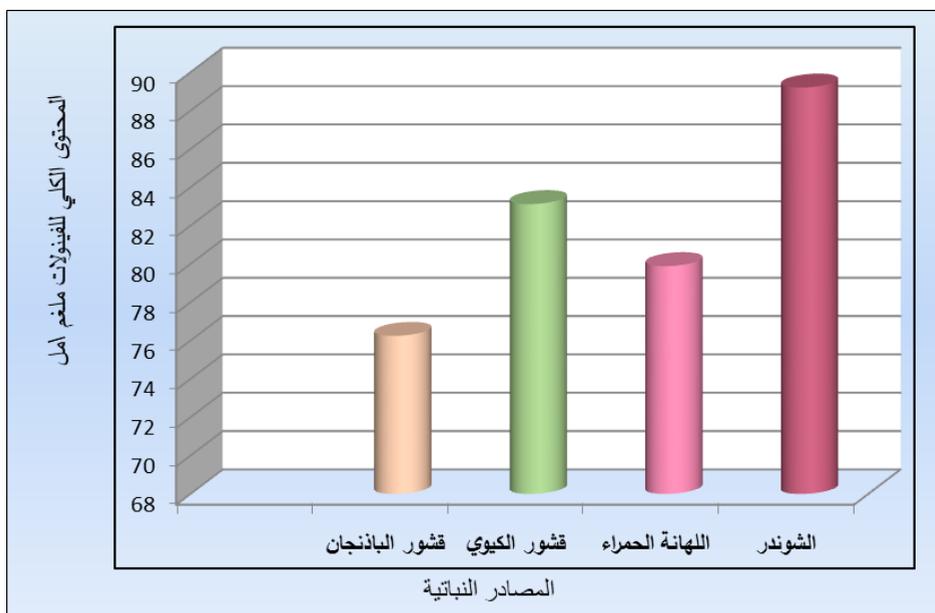
ت	المستخلصات النباتية	قطر التثبيط (مم)
١	الكيوي	20
٢	الباذنجان	13
٣	الهانة الحمراء	16
٤	الشوندر	٠



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

### 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 ٨٩.٢١ ملغم/GAE/مل، أما في قشور الكيوي فكانت نسبة المركبات الفينولية أقل ٨٣.١٣ ملغم/GAE/مل، في حين كان أقل محتوى للمركبات الفينولية في قشور الباذنجان وهي ٧٦.٢٥ ملغم/GAE/مل. وان سبب هذا الاختلاف في كمية المركبات الفينولية بين المستخلصات النباتية قد يعود الى طبيعة المركبات المفصلة والاجزاء النباتية المستعملة والى قطبية المذيب المستعمل في الاستخلاص.



شكل (٨) المحتوى الكلي للمركبات الفينولية للنباتات قيد الدراسة

## References

- 1- Allen, K.; Wałęcka-Zacharska, E.; Kosek-Paszowska, K.; Devlieghere, F.; Van Meervenue, E.; Osek, J.; Wiczorek, K.; Bania, J. *Listeria monocytogenes*—An examination of food chain factors potentially contributing 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. Efficiency 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.

- 6- Borderías, A.J.Sánchez-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.; Gędas, 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

- 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 monocytogenes: Methods and Protocols*, 15-30.
- 17- monocytoenes: 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. *Animals*10(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.

- 21- Numman, I. (2017). Study of Lectins extract from Reseda odorta L and Peel 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.

- (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

- 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>.

- 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 3<sup>rd</sup> International Conference of {Fmvironmental and Agricultural Status in the Micide East) 14 - 16 July 2020, Cairo-Egypt.