تأثير بادئ اللبن (اليوغرت) في نمو بكتيريا *Bacillus cereus*

حامد صالح محمد

قسم علوم الأغذية والتقانات الأحيائية /كلية الزراعة والغابات/جامعة الموصل

الخلاصة

درس تأثير بكتيريا حامض اللاكتيك لبادئ اللبن *Streptococcus salivarius* و *Lactobacillus delbrueckii* و *Streptococcus thermophilus sub_sp.thermophilus* و *Lactobacillus bulgaricus sub_sp.bulgaricus* (*Lactobacillus bulgaricus*) في خلايا وسبورات بكتيريا *Bacillus cereus* اثناء تصنيع اللبن وتخزينه على درجة حرارة ٧م لمدة ٧ أيام . وجد بان بكتيريا *B. cereus* المقاومة لدرجات الحرارة العالية والمعزولة من الحليب الخام البقري لا تتأثر في نمو بادئ بكتيريا حامض اللاكتيك في صناعة اللبن، لكن بادئ بكتيريا حامض اللاكتيك تثبط من نمو بكتيريا *B.cereus* كخلايا خضرية وسبورات ، وان انتاج الحموضة في اللبن لم يتأثر بنمو هذه البكتيريا وعليه نادرا ما يحدث بسموم هذه البكتيريا عند تناول هذا المنتج نتيجة لخفض عدد البكتيريا المسببة للتسمم الى اقل من 10^6 c.f.u./مل الحد المطلوب لحدوث التسمم .

المقدمة

تتبع بكتيريا *Bacillus cereus* عائلة Bacillaceae وهي مقاومة لدرجات الحرارة العالية او محبة لها وتمتاز بانها مكونة للابواغ البكتيرية (Spores) وتشمل جنسين هما *Bacillus* وهو ينمو في الظروف الهوائية و *Clostridium* فيتنمو في الظروف اللاهوائية واهم مصادرهما التربة والهواء والماء وعليقة الحيوانات والسيلاج ، وبكتيريا *B. cereus* تنتشر في الطبيعة وتسبب تسمم غذائي (Tayler و Gilber ، ١٩٧٦ ، ومحمد واحد ، ١٩٩٦ و Gadaga و اخرون ، ٢٠٠٤) ومن المهم جدا معرفة اعداد هذه البكتيريا في الغذاء لحدوث التسمم، اذ ذكر Paul و Cotter (٢٠٠٣) بانه يجب ان يكون عدد البكتيريا اكثر من 10^6 c.f.u./مل في الغذاء حتى يحدث التسمم الغذائي ، والنواتج الايضي لهذه البكتيريا نوعان الاول بروتين معقد ذو وزن جزيئي عالي يسبب الاسهال والثاني ببتييد دائري مقاوم للحرارة وذو وزن جزيئي منخفض يسبب التقيؤ . في المملكة المتحدة و استراليا *Bacillus cereus* المسؤولة عن ٥% من حالات التسمم بينما في الدول الاسكندنافية وكندا ١٠-٤٧% والدول الاسيوية تصل الى ٤٢% (Wijaya ، ٢٠٠٥) لهذا يجب استخدام طرق عديدة للسيطرة على هذه البكتيريا وخفض اعدادها الى حد الامان ، وهذا النوع له سلالات عديدة مسببة التسمم الغذائي وهو مشابهة للتسمم الغذائي ببكتيريا *Cl. Perferingens* ويحدث التسمم ببكتيريا *Bacillus cereus* في الاغذية البروتينية وليس النشوية وتكون مدة الحضانة من ١-١٣ ساعة والاعراض الم في المعدة واسهال وغثيان وتقيؤ واعداد البكتيريا للاصابة بالتسمم يصل الى 10^6 c.f.u./مل من الغذاء (Goepfert و اخرون ، ١٩٧٢) والسهم من النوع (Enterotoxin) التسمم المعوي ويتأثر بعده عوامل مثل الاس الهيدروجيني (pH) الامثل لانتاجه (٧-٧,٥) ويتوقف عند اقل من pH (٦,٢) ودرجة الحرارة المثلى لانتاجه هي ٣٠م وافضل تركيز للاوكسجين ٠,٠٢ ضغط جوي ويتحطم السم عند درجة حرارة ٥٦ م لمدة ٣٠ دقيقة (Gilbert ، ١٩٧٦) وتؤدي بكتيريا حامض اللاكتيك تؤدي الى انتاج حموضة وخفض pH وبالتالي تثبط نمو البكتيريا لانتاج السموم وعليه هدفت الدراسة سلوك بكتيريا *B. cereus* وسبوراتها في اللبن وتأثير بادئ اللبن وصفات اللبن على نمو هذه البكتيريا.

مواد البحث وطرقه

تم تنمية بكتيريا *B. cereus* المنشطة والمعزولة من الحليب البقري الخام في وسط اجار مغذي احتوى على ٠,٥% من $MnSO_4$ و ٠,٥% $MgSO_4$ والتحصين لمدة ٧ أيام على ٣٠م وبعدها تم غسل السبورات من سطح الاجار بمحلول معقم من ٠,١ مولر فوسفات البوتاسيوم ذو pH ٦,٨ وركزت

السبورات بالطرد المركزي على ٣٠٠٠ دورة /دقيقة لمدة ١٥ دقيقة وعلقت السبورات المترسبة بمحلول الفوسفات المعقم واعيدت العملية مرة اخرى بحيث حصلنا على عدد ١٠^٧ سبور/مل وحفظت على ٤ م° لحين الاستخدام . عوملت السبورات على ٨٠ م° لمدة ١٠ دقائق لغرض اجراء صدمة حرارية للانبات وزرعت في وسط آجار مغذي وحضنت على ٣٢ م° لمدة ١٢ ساعة وكان العدد ١٠^٧ c.f.u./مل وحفظت بالتبريد (Shehata وآخرون، ١٩٧٧).

أخذ حليب بقري وسخن على ٨٥ م° لمدة ١/٢ ساعة وبرد على درجة حرارة ٤٢ م° واجري ما ياتي:
أ- لقح الحليب ببادئ اللبن لبكتيريا حامض اللاكتيك النشطة بنسبة ٢% وحضن على ٤٢ م° لمدة ٤ ساعات.
ب- لقح الحليب بمقدار ٢% من بادئ بكتيريا حامض اللاكتيك وحضن على ٤٢ م° لمدة ٤ ساعات واضيفت له سبورات بكتيريا *B. cereus* قبل التحضين .
ج- حضر لبن بالطريقة السابقة نفسها واضيفت له خلايا خضرية من بكتيريا *B. cereus* قبل التحضين.
د- حليب بقري لقح بسبورات بكتيريا *B. cereus* .
هـ- حليب بقري لقح بخلايا خضرية من بكتيريا *B. cereus* .
وحفظت العينات (أ و ب و ج و د و هـ) جميعها على ٧ م° لمدة ٧ أيام .
اخذت عينات لغرض الزرع وللمدد ١ و ٢ و ٣ و ٤ ساعات المحضنة على ٤٢ م° وعينات حفظت على ٧ م° لمدة ٧ أيام مع قياس ال pH والحموضة كحامض لاكتيك. نميت بكتيريا حامض اللاكتيك للبن على بيئة ال روجوزا (MRS) بينما *B. cereus* على Milk starch agar (محمد واحمد، ١٩٩٦) .

النتائج والمناقشة

تم عزل وتنقية وتشخيص بكتيريا *B. cereus* من الحليب البقري الخام باستخدام الوسط الغذائي Milk starch agar والمكون من آجار مغذي و ١,٠% ونشأ ذائب و ١% حليب فرز بعد تعقيم الوسط الغذائي بالمؤصدة على ١٢١ م° لمدة ١٥ دقيقة وبالتحضين على ٣٠ م° لمدة ٤٨ ساعة وبالاتماد على طريقتي Gibbs و Shapton (١٩٦٨) و Gibson و Gordon (١٩٧٥) ، ودرست صفاتها حسب طريقة Gibson و Gordon (١٩٧٥). وذلك باجراء الاختبارات المورفولوجية والفسولوجية اللازمة والمدرجة في الجدول (١) حيث امكن التوصل الى ان الجنس هو *Bacillus* في حين كان النوع *B. cereus* . وحفظت هذه بكتيريا بتنميتها على وسط الآجار المائل Milk starch agar والزرع بطريقة التخطيط والتحضين على ٣٠ م° لمدة ٤٨ ساعة ثم الحفظ في الثلاجة لحين الاستخدام مع تجديد المزرعة كل شهر.

الجدول (١) : الاختبارات المورفولوجية والفسولوجية المستخدمة لتشخيص بكتيريا *B. cereus*

نوع الاختبار	النتيجة	نوع الاختبار	النتيجة	نوع الاختبار	النتيجة
تخمير الرافينوز	+	النمو على درجات الحرارة		الصفات المورفولوجية:	
= مانوز	+	١٠ م°	+	الحركة	متحرك
= مانيتول	+	٣٧ م°	+	صبغة كرام	G+
النمو اللاهوائي في بيئة الكلوكون	+	٤٥ م°	+	موقع الجرثومة	وسطى
اسالة الجلاتين	+	٦٠ م°	-	الشكل	عصوي
تحلل النشأ	+	اختبار فوكس بروسكر	+	نظام التجمع	بشكل سلسلة قصيرة
افراز انزيم الليستيناز	+	اختبار انتاج الاندول	-	المستعمرات	خشنة جافة ومنتشرة والحافة غير منتظمة

+،- اختبار موجب وسالب ، على التوالي .

نجد من الجدول (٢) ان السبورات والخلايا الخضرية لبكتيريا *B. cereus* لم تؤثر في نمو بكتيريا حامض اللاكتيك (*Lacto. bulgaricus*, *Str. thermophilus*). ان اعداد سبورات بكتيريا *B. cereus* في الحليب المعقم في بداية التحضين على ٤٢ م كانت ٦ x ١٠ سبور/مل وازدادت اثناء مدة التحضين اذ وصلت بعد ٤ ساعات من التحضين الى ٨٢ x ١٠ سبور/مل بينما نجد اعداد بكتيريا حامض اللاكتيك في بداية التحضين كانت ١ x ١٠ c.f.u./مل وازدادت بعد ٤ ساعات الى ٢ x ١٠ c.f.u./مل في حين لم يحدث زيادة في اعداد سبورات بكتيريا *B. cereus* عند تنميتها مع بكتيريا حامض اللاكتيك في اللبن وهذا يدل على ان بكتيريا بادئ اللبن ادت الى تثبيط نمو السبورات البكتيرية اذ نجد ان اعدادها لم تتغير بعد ٤ ساعات من التحضين وكانت ٧ x ١٠ سبور/مل.

الجدول (٢): تأثير بكتيريا حامض اللاكتيك المستخدمة كبادئ في اللبن على السبورات والخلايا الخضرية لبكتيريا *B. cereus*

مدة التحضين (ساعة)	اعداد بكتيريا حامض اللاكتيك c.f.u./مل	سبورات البكتيريا في الحليب سبور/مل	سبورات البكتيريا في اللبن سبور/مل	الخلايا الخضرية البكتيرية في الحليب c.f.u./مل	الخلايا الخضرية البكتيرية في اللبن c.f.u./مل
صفر	١ x ١٠	٦ x ١٠	٧ x ١٠	١ x ١٠	٣ x ١٠
١	٣ x ١٠	٧ x ١٠	٧ x ١٠	٣ x ١٠	٤ x ١٠
٢	٢ x ٦١٠	٧ x ١٠	٧ x ١٠	٦ x ١٠	٦ x ١٠
٣	٧ x ٦١٠	٨ x ١٠	٧ x ١٠	٧ x ٥١٠	٥ x ١٠
٤	٢ x ٧١٠	٨٢ x ١٠	٧ x ١٠	٢ x ٦١٠	٧ x ٣١٠

التحضين على ٤٢ م لمدة ٤ ساعات .

ومن الجدول نفسه ازدادت اعداد الخلايا الخضرية لبكتيريا *B. cereus* في الحليب المعقم من ١ x ١٠ c.f.u./مل لتصل في نهاية التحضين الى ٢ x ١٠ c.f.u./مل وعند تنميتها مع بادئ اللبن في الحليب المعقم انخفضت من ٣ x ١٠ c.f.u./مل الى ٧ x ١٠ c.f.u./مل بعد ٤ ساعات من التحضين على ٤٢ م . وهذا يدل على ان بادئ بكتيريا حامض اللاكتيك للبن ادى الى تثبيط نمو هذه البكتيريا وهذا متفق مع ما وجدته Drissen وStadhouders (١٩٨٣) بان بكتيريا حامض اللاكتيك لها تأثير مثبط على نمو جنس *Bacillus* ومنها *B. cereus*.

ومن الجدول (٣) نلاحظ بان الحموضة الابتدائية للحليب الملقح ببكتيريا حامض اللاكتيك كانت ٠,١٩% والـ pH ٦,٦ وبعد الزرع والتحضين على ٤٢ لمدة ٤ ساعات اصبحت الحموضة ٠,٧٦% والـ pH ٤,٦، من ذلك نجد ان الحموضة قد ازدادت بمقدار اربعة اضعاف عن بداية الزرع . في حين الحليب الملقح ببكتيريا *B. cereus* كانت الحموضة الابتدائية ٠,١٩% والـ pH ٦,٦، على التوالي . وبعد ٤ ساعات من التحضين على ٤٢ م كانت الحموضة النهائية ٠,٦٧% والـ pH ٤,٦ في حين نجد ان السبورات لبكتيريا *B. cereus* المنماة مع بادئ اللبن في الحليب المعقم كانت الحموضة فيها ٠,١٩% والـ pH ٦,٦ وبعد ٤ ساعات من التحضين على ٤٢ م اصبحت الحموضة ٠,٧٧% والـ pH ٤,٦ . وايضا نجد في حالة زرع الخلايا الخضرية لبكتيريا *B. cereus* في الحليب المعقم كانت الحموضة والـ pH الابتدائيان ٠,١٩% و ٦,٦، على التوالي وبعد ٤ ساعات من التحضين بلغتا ٠,٢٩% و ٣,٦، على التوالي . وفي حالة تلقيح سبورات بكتيريا *B. cereus* في الحليب المعقم كانت الحموضة الابتدائية ٠,١٩% والـ pH ٦,٦ وبعد ٤ ساعات من التحضين بلغت ٠,٢٧% والـ pH ٦,٤.

نستنتج من ذلك بان الزيادة في الحموضة والانخفاض في الـ pH تساعد في سرعة تخثر الحليب وان الحموضة لا تؤثر على فعالية بادئ بكتيريا حامض اللاكتيك المستخدمة في انتاج الحموضة وهذا ما وجدته Mohran و Said (١٩٩٠) .

الجدول (٣): الحموضة الكلية و pH للحليب المزروع ببكتيريا حامض اللاكتيك مع أو بدون الخلايا الخضرية وسبورات بكتيريا *B. cereus*

حليب ملقح ببكتيريا		حليب ملقح بالخلايا الخضرية للبكتيريا		حليب ملقح ببادئ اللبن والسبورات البكتيرية		حليب ملقح ببادئ اللبن والخلايا الخضرية للبكتيريا		حليب ملقح ببادئ اللبن		مدة التحضين (ساعة)
pH	حموضة %	pH	حموضة %	pH	حموضة %	pH	حموضة %	pH	حموضة %	
٦,٦	٠,١٩	٦,٦	٠,١٩	٦,٦	٠,١٩	٦,٦	٠,١٩	٦,٦	٠,١٩	صفر
٦,١	٠,٤٩	٦,٥	٠,٢٢	٦,٠	٠,٥٠	٦,١	٠,٢٠	٥,٧	٠,٥٤	١
٥,٧	٠,٥٤	٦,٤	٠,٢٤	٥,٦	٠,٥٥	٥,٧	٠,٥٠	٥,١	٠,٦١	٢
٥,٢	٠,٦١	٦,٤	٠,٢٦	٥,٢	٠,٦٠	٥,١	٠,٥٥	٤,٦	٠,٧٦	٣
٤,٦	٠,٧٦	٦,٣	٠,٢٩	٤,٦	٠,٧٧	٤,٦	٠,٦٧			٤

التحضير على درجة ٤٢ م لمدة ٤ ساعات .

من الجدول (٤) نجد ان الحموضة الكلية و pH في اللبن المحفوظ لمدة ٧ أيام على ٧ م كانت في اليوم الاول ٠,٧٩ % و ٤,٥ ، على التوالي وبعد ٧ أيام أصبحت ٠,٨٠ % و pH ٤,٥ في حين اللبن المضاف له خلايا خضرية وسبورات لبكتيريا *B. cereus* لم تتغير فيها الحموضة و pH بينما نجد الحليب المضاف له خلايا خضرية من بكتيريا *B. cereus* وحفظ لمدة ٧ أيام على ٧ م كانت الحموضة الكلية و pH في بداية الحفظ ٠,٣٠ % و ٦,٣ ، على التوالي وأصبحت ٠,٣٢ % و ٦,٢ ، على التوالي حيث لاحظ تغير طفيف في ذلك وان درجة الحرارة المنخفضة أدت الى تثبيط او وقف نشاط بادي اللبن وبكتيريا *B. cereus* في الحليب .

ونستنتج من ذلك بان بادي بكتيريا حامض اللاكتيك اللبن أدى الى خفض اعداد بكتيريا *B. cereus* الى اقل من العدد الذي يؤدي الى التسمم الغذائي وبهذا تمنع حدوث التسمم الغذائي ببكتيريا *B. cereus* .

الجدول (٤): الحموضة الكلية و pH للحليب المزروع ببكتيريا حامض اللاكتيك مع أو بدون الخلايا الخضرية و سبورات بكتيريا *B. cereus* .

حليب ملقح ببادئ اللبن		حليب ملقح ببادئ اللبن وخلايا بكتيريا		حليب ملقح ببادئ اللبن والسبورات البكتيرية		حليب ملقح بالخلايا الخضرية للبكتيرية		حليب ملقح بالسبورات البكتيرية		مدة الحفظ (يوم)
pH	حموضة %	pH	حموضة %	pH	حموضة %	pH	حموضة %	pH	حموضة %	
٤,٥	٠,٧٩	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	١
٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٢
٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٣
٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤
٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٥
٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٦
٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٤,٥	٠,٨٠	٧

التحضير على ٧ م لمدة ٧ أيام .

EFFECT OF YOGHURT STARTER LACTIC ACID BACTERIA ON *Bacillus cereus*

Hamed Saleh-al-Badrany

Food Sci. and Biotechnology Dept., Collage of Agric. & Forestry, Mousl Univ.,
Iraq

ABSTRACT

The growth of lactic acid bacteria of yoghurt culture *Str.salivarius sub-sp thermophilus* (*Str. thermophilus*) and *Lacto bacillus delrueckeeii sub-sp_bulgaricus* (*Lacto. bulgaricus*) in milk inhibited the growth of vegetative cells of *B .cereus* and spores that resisted the high heat treatment which was isolated from raw milk and prevented the *B .cereus* from producing the enterotoxins in yoghurt . The *B .cereus* did not affect the growth of yoghurt starter culture, also the rate of acid development in yoghurt was not affected in the presence of *B. cereus*. The poisoning by this bacteria did not happen in dairy product when number decreased to less than 10^6 c.f.u. /ml .

المصادر

- محمد ، حامد صالح وصلاح عمر احمد (١٩٩٦) بكتيريا *B .cereus* في بعض منتجات الالبان في الموصل . مجلة زراعة الرافدين ٢٨ (٤).
- Driesson , F.M. and G.stadhouders (1983).A new defect in stirred yoghurt. Dairy Sci. Abstract 45:3881.
- Gadaga, T.H., L. k. Nyanga and AN. Mutakumira (2004) . The occurrence and contra of Pathogens in African ferments foods , African J. of food , Agriculture, Nutrition and Development 4(1):129-163.
- Gibbs, B. M. and D.A. Shapton (1968) . Identification methods for dairy microbiologists, Academic press, London- New York .
- Gibson, T. and R.E.Gordon (1975) . Bergy's Manuel of determinative bacteriology: 8th .ed Buchanan R-E and Gibson .Y.E-eds. P:529 .The Williams and Wilkins, Bahamas, USA .
- Giberl, R.J. and. A.J. Taylor (1976). *Bacillus cereus* food poisoning in microbiology p: 197. Society for applied bacteriology symposium .serious No. 4 Academic press London.
- Gilbert, R. J. (1976). (In food born infections and intoxication) (Riemann, H and F.L. Bryaneds) P: 495, Academic press N.Y.
- Goepfert, J. M., W.M. Spira and H. U. Kim (1972) . *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review J. Milk Food Technol. 38(4): 213-224.
- Mohran, M. R. and M. R.said(1990). Behavior of microbial contaminants in zebady during fermentation and storage . Egyptian J.Dairy Sci.,18:761-741.
- Paul, D .C .and H. Cotter (2003) . Surviving the acid test : responses of Gram positive bacteria to low pH. Microbiology and Molecular Biology reviews 67: 429-453.
- Shehata, A. E., S. M., Khalafalla, M. N. I., Magdoub, and A.A. Hofe, (1977).Thermo destruction of some bacillus spores in chocolate flavored milk. Egyption J.Dairy Sci. 5: 135-142.
- Wijaya, A. (2005). Unraveling the role of Bacillus involved in food poisoning and food spoilage. Microgen Bioproducts New sletter N18.