مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية ـ (2012) المجلد (28) ـ العدد 1 ـ الصفحات: 275-287

دراسة الأثر التثبيطي لبكتريا بادئ اليوغورت إزاء نمو *Escherichia coli* O157:H7

عهد أبو يونس[1] و سمير سليق[1] و صياح أبوغرة [1]

الملخص

هدف هذا البحث الذي أجري في مخابر كلية الزراعة بجامعة دمشق قسم علوم الأغذية إلى دراسة الأثر التثبيطي لنمو بكتيريا حمض اللبن ونشاطها المستخدمة كبادئات في صناعة اليوغورت في نمو *E. coli O157:H7*، وقد استخدم من أجل ذلك سلالة نقية من *E. coli O157:H7* وكذلك من البادئ إذ درس تأثير بادئ حمض اللبن (*Streptococcus thermophilus* و*Lactobacillus bulgaricus*) في أعداد *E. coli O157:H7*، التي لُقّحت في الحليب المعد لصناعة اليوغورت، وحفظ اللبن الناتج في درجتي حرارة 37°م و4°م. لوحظ انخفاض تدريجي في أعداد *E. coli O157:H7* تبعاً للزمن، وكان انخفاض أعدادها أكثر وضوحاً عند استخدام البادئ المزدوج ومن ثم *Lb. bulogaricus* وحدها كبادئ، وكان أقل انخفاض في الأعداد حدث عند استخدام *S. thermophilus* وحدها كبادئ، وكانت قدرتها على البقاء في الدرجة 37°م أقل في الحالات كلها من الدرجة 4°م.

الكلمات المفتاحية: *Escherichia coli* O157:H7، بادئ، اللبن الرائب، التضاد.

[1] قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، ص.ب. 30621 ، جامعة دمشق، سورية.

Study of The Inhibition Effect of Yoghurt Starter on The Growth of *Escherichia coli* O157:H7

A. Abou Younes[(1)]; S. Slik[(1)] and S. Abou Ghorra[(1)]

ABSTRACT

This research was conducted in the laboratories of Faculty of Agriculture – Damascus University Department of Food Sciences. The aim of this research was to study the inhibition effect of the growth and activity of *Lactic acid bacteria* as starter in yoghourt, on the growth of *E. coli O157:H7* bacteria. A pure strains of *E. coli O157:H7* and *Lactic acid bacteria* was used for this study.

The effect of *Lactic acid bacteria* (*Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*) in the number of *E. coli O157:H7* was studied in 37 °C and 4°C. The *Lactic acid bacteria* was inoculeted in milk which was prepared to manufacture the yoghurt. The number of *E. coli O157:H7* was gradually decreased with the time. The decline number of this bacteria was clear when *S. thermophilus* and *Lb. bulgaricus* were used as a mixture starter , then when *Lb. bulgaricus* was used as a single starter then *S. thermophilus* was used a single, In the other hand, the inhibition effect was weaker at 37 C and stronger on 4 C.

Key Words: *E. coli* O157:H7, Yoghurt, Starter, Inhibition.

[(1)] Dep. food sciences ,Facu.,Agric.,P.O.Box 30621. univ. Damascus.

المقدمة

جهد العلماء في توفير الغذاء الصحي الخالي من البكتيريا الممرضة طوال السنوات الماضية بالاعتماد على إضافة بعض المركبات الكيميائية التي تعمل على حفظ المادة الغذائية لتصل إلى المستهلك خالية من عوامل الفساد التي تسببها البكتيريا، ونظراً إلى أن بعض هذه المواد الحافظة الكيميائية قد ثبت ضررها للإنسان فقد اتجه الباحثون إلى المواد الحافظة الطبيعية، وقد وجدوا في بكتيريا حمض اللبن ضالتهم إذ إن لبكتيريا حمض اللبن المقدرة على منع نمو البكتيريا الممرضة في أثناء النمو في المواد الغذائية (Barefoot and Nettles, 1993)، وتعود المقدرة بسبب إنتاج الأحماض العضوية أو إنتاج المضادات البكتيرية Bacteriocins (Brashears, and Durre, 1999).

هدف البحث

وقد هدف البحث إلى دراسة الأثر التثبيطي لنمو بكتيريا حمض اللبن المستخدمة كبادئات في صناعة اللبن المحلي ونشاطها في نمو بكتيريا *E. coli* O157:H7 الممكن وجودها في الحليب المعد لتصنيع اللبن وذلك عند التخزين في درجتي 37°م و4°م.

الدراسة المرجعية

من البكتيريا التي يمكن لها الانتقال عبر منتجات الألبان بكتيريا *Escherichia coli* المعروفة بأنّها بكتيريا موجودة في الفلورا الطبيعية لقولون الإنسان والحيوانات، وفي عام 1982، عرف النوع *E. coli* O157:H7 كمسبب للمرض عند الإنسان وأُثبت انتقاله عبر الغذاء (Mermelstein, 1993) (WHO,1997)، وصنفت بوصفها من البكتيريا المسببة للتسمم الغذائي (Arocha *et al.*, 1991)، وقد ارتبطت معظم الحالات بتناول منتجات الألبان (Reitsma, and Henning, 1996)، مع أن بداية هذا المرض يبدأ من الماشية وينتقل عبر اللحم والحليب إلى الإنسان نتيجة تناول الأغذية المصنعة منها (Borczyk *et al.*, 1987)، وقد أكد مركز CDC (مركز التحكم بالأمراض وتجنب حدوثها) أن هذه البكتيريا تسبب سنوياً نحو 73000 حالة إصابة ناتجة عن تناول منتجات الألبان، 61 % من هذه الحالات تنتهي بالوفاة (Smith *et al.*, 2005).

وتتبع بكتيريا *E. coli* O157:H7 مجموعة (Enterohemorrhagic *E. coli*) المعروفة بالرمز EHEC وهي المجموعة التي تنتمي لها سلالات بكتيريا *E. coli* جميعها التي تنتج السموم في الوسط وتسبب الإسهال (diarrhea) والتهاب القولون النزفي (hemorrhagic colitis) ومتلازمة انحلال الدم عند الإنسان (hemolytic uremic) (Doyle, 1991)، وتميز سلالة *E. coli* O157:H7 عن باقي سلالات *E. coli* بأنها غير مخمرة للسوربيتول وسلبية اختبار MUG، هذه الاختبارات تسمح بتمييزها عن باقي السلالات. يستخدم لعزلها بيئة Sorbitol-MacConkey agar بعد

إجراء عملية إغناء أوليـة بمـرق البتـون (Tosun *et al.*, 2007). ويمكـن لـسلالة O157:H7 النمو بين درجتي الحرارة 7°م و46°م، درجة حرارة النمو المثلى 37°م، كما بينت الدراسات إمكانية وجودها في درجـات حـرارة أقـل مـن 6°م (Doyle *et al.*, 1997). كما تنمو في مجال من درجات pH يراوح بين 4.4 و9 وتعد الدرجة 7 درجـة pH المثلى للنمو (Doyle *et al.*, 1997).

تختلف مقدرة السلالات على الوجود في الوسط الغذائي تبعاً لنوعية الحمض الموجود في الغذاء (Vialette *et al.*, 2003) (إذ إن أكثر الأحماض تأثيراً هـو حمـض اللـبن وحمض الخل يليهما حمض كلـور المـاء) (Doyle *et al.*, 1997)، ودرجـة حـرارة التخزين (Janes *et al.*, 2002)، فضلاً عن إمكانية الاختلاف الـوراثي بـين سـلالات *Escherichia coli* O157:H7 نفـسها (Kim *et al.*, 1999). ومـن المعـروف أن *Escherichia coli* غير مقاومة للحموضة وأن 99% منها يمكن القضاء عليها باستخدام أحماض مخففة (Scott *et al.*, 2000). فـي حـين بينـت كثيـر مـن الدراسـات أن *Escherichia coli* O157:H7 أكثر مقاومة للحموضة (Hovde *et al.*, 1999)، في دراسة Jarret وزملائه عام 2007 جرت حول تحمل مجموعة مختلفـة مـن سـلالات *Escherichia coli* O157:H7، وجدوا أن بعض من السلالات استطاعت تحمل درجة pH وصلت حتى 3.5 عند تحميض البيئة بحمض اللبن، في حين أن سلالات أخرى فـي شروط التجربة نفسها لم يلاحظ وجودها عند pH 4.89.

ووجدت الدراسات المتعلقة بوجود *E. coli* O157:H7 في الأغذيـة المتخمـرة أن انخفاض pH الأغذية مع وجود بكتيريا حمض اللبن لا يتـضمن دائمـاً انعـدام وجـود *E. coli* O157:H7 في الأغذية، وإن انخفاض الحموضة يؤدي دوراً فقط فـي الـدور الممرض للبكتيريا (Dineen *et al.*, 1998)، ففي عام 1997 أكد Hudson وزمـلاؤه أن بادئ اليوغورت المستخدم يخفض تعداد *E. coli* O157:H7 بشكل تدريجي من 10^7 خلية/ مل حتى 10^2 خلية/ مل خلال ثمانية أيام من التخزين في الدرجـة 4°م، ولكنـه لا يعدم وجودها. وقد قام العالمان Issa وRyser عام 2000 بدراسة اللبنة المصنعة بطريقة تقليدية في منطقة الشرق الأوسط، وذلك ببسترة الحليب الخام في الدرجة 85°م مـدة 30 ثانية ومن ثم تبريده وتلقيحه بالبكتيريا الممرضة بأعداد 2×10^3 حتى 6×10^3 خليـة /مل حليب، من كل من بكتيريا*Escherichia coli O157:H7* وقـد أُضـيف البـادئ التجاري بنسبة 2% ليتم تصنيع اليوغورت الذي خُزن فيما بعد بدرجة حرارة 6°م مـدة 12- 16 ساعة. ومن ثم حضرت اللبنة من اللبن المصنع سابقاً بإجراء عمليـة تـصفية، وهي الطريقة المتبعة في إنتاج اللبنة التقليدية في الشرق الأوسط، وخُزنت عينات اللبنـة في الدرجة 6°م. فقد لاحظا ارتفاع أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 من 0.46 لوغاريتم إلى 1.19 لوغاريتم في بداية التجربة، الذي انخفض بعدها ثم انعدام بعد مرور يومين من

التخزين في درجة حرارة 6°م. ويعزى هذا الانخفاض والانعدام في وجود البكتيريا إلـى انخفاض في درجة حموضة اللبنة إلى درجة لا تستطيع معها البكتيريا الممرضـة النمـو والوجود. وقام Massa وزملاؤه عام 1997 وبتلقيح حليب بقر معقم بأعداد بـين 10^3 – 10^7 خلية/مل من بكتيريا *E. coli* O157 : H7 وتخميره مدة 5 ساعات، كـان البـادئ المستخدم مزدوجاً مكوناً من *S.thermophilus* و*Lb. bulgaricus* وبعد مرور 7 أيـام من التخزين في الدرجة 4°م، انخفض العدد من 3.52 إلى 2.7 لوغارتم خلية/مل حليـب وانخفضت درجة pH من 6.6 إلى نحو 4.5. وقـام Simesk وزمـلاؤه عـام 2005 بدراسة سلوك *E. coli* O157:H7 في أثناء تخزين Ayran المصنع باستخدام بكتيريـا *Lb. bulgaricus* و*Stre. thermophilus* وصلت درجة pH العيران إلـى 4.4 و4.6 بتخزين العينات في 4°م مدة 21 يوماً، في أثناء مدة التخزين لوحظ انخفاض تعـداد *E. coli* O157:H7 من 6.4 إلى 3.1 لوغاريتم في pH ساوت 4.4 ومـن 6.3 إلـى 3.1 لوغاريتم عند pH يساوي 4.6. فضلاً عن انعدام وجود *E. coli* O157:H7 في اليـوم 14 من التخزين، في حين كان وجود بكتيريا *Lb. bulgaricus* و*Stre. thermophilus* قد بلغت 4 - 5 لوغاريتم.

مواد البحث وطرائقه

من أجل دراسة الأثر التثبيطي لبادئ اليوغورت تجـاه بكتيريـا *E. coli* O157:H7: عومل حليب بقري خالي الدسم معاد التشكيل لاستخدامه في تصنيع اليوغورت فيما بعـد في الدرجة 121° م مدة 15 ثانية، ثم برد الحليب إلى الدرجة 37°م، ثـم لُقِّـح الحليـب ببكتيريا *E. coli O157:H7* سلالة نقية منمطة في مصر – جامعة أسيوط ، بأعداد نحو 10^5 - 10^6 خلية/مل. صنّع اليوغورت باستخدام بادئ مزدوج من بكتيريا حمض اللاـبن بنسبة 1: 1. كما تم تصنيع اللبن باستخدام بادئات مفردة بتجربتين منفـصلتين، التجربـة الأولى صنع اللبن باستخدام بكتيريا *Str.thermophilus* كبادئ مفرد، أما التجربة الثانية فقد صنّع اللبن فيها باستخدام بكتيريا *Lb.bulgaricus* بمفردها كبـادئ، مـع العلـم أن إضافة الكميات من البادئ جاءت بحسب تعليمات الشركة المصنعة. وفي كل تجربة جرى التحضين في الدرجة 42°م حتى حصول التخثر، ومن ثم خزنت مرة في الدرجـة 37°م وأخرى في الدرجة 4°م، وقد أحضرت سلالات بكتيريا حمض اللبن المستخدمة كبادئ من شركة CHR HANSEN - الدنمارك.

استُعين بثلاث تجارب كشاهد: الأولى بتمنية بكتيريا *E. coli* O157:H7 بتركيز 10^5 - 10^6 خلية/مل ودون أية إضافات إلى الحليب المستخدم في التجـارب نفـسها، حيـث حضنت في الدرجة 37°م، والشاهد الثاني كـان بتخـزين بكتيريـا *E. coli* O157:H7 بتركيز 10^5 - 10^6 خلية/مل ودون أية إضافات في الدرجة 4°م، بعد ذلـك درس تغيـر

أعدادها تبعاً للزمن 0 – 6 – 12 – 24 – 48 – 72 ساعة من تلقيح الحليب. أما تجربة الشاهد الثالثة فقد جرت بتحميض الحليب المعقم الخالي من الدسم والملقح بـ *E. coli* O157:H7 بتركيز 10^5 - 10^6 خلية/ مل، بتراكيز مختلفة من حمض اللبن تركيزه 10% للوصول إلى درجات pH 6.6، 5.2، 4.5، 4، 3.2 و2.8 .

درست أعداد بكتيريا *E. coli* O157:H7 باستخدام بيئة VRB أغار خلال المدد الزمنية للدراسة، وذلك بالتحضين في الدرجة 37 °م، وأعداد كل من بكتيريا *Str.thermophillus* في بيئة M17 بالتحضين في الدرجة 45°م، وبكتيريا *Lb.bulgaricus* في بيئة Rogosa بالتحضين في الدرجة 45°م وفي درجتي الحرارة المستخدمتين بالتجارب (37°م و4°م).

جرى التحليل الإحصائي باستخدام البرنامج الإحصائي SPSS، طريقة القطاعات العشوائية بالاعتماد على ثلاثة عوامل وثلاثة مكررات، العامل الأول هو نوع بكتيريا حمض اللبن المستخدمة كبادئ في تصنيع اللبن، والعامل الثاني هو المدة الزمنية التي أخذت بها القراءة، والعامل الثالث هي درجة حرارة التخزين وتعبر المكررات عن أعداد بكتيريا *E. coli* O157:H7 في اللبن.

النتائج والمناقشة

لُقّح الحليب المعد لصناعة اليوغورت ببكتيريا *E.coli* O157:H7 إذ بلغ التعداد نحو 10^5-10^6 خلية/مل، ثم صنّع اليوغورت باستخدام البادئ المختلط بنسبة تلقيح 2% ووضع المزيج في الدرجة 42°م مدة 4 ساعات ثم خزن المزيج تجربة 1 (في الدرجة 37°م) و تجربة 2 (في درجة حرارة 4°م)، وأجريت تجربة الشاهد 1 بتنمية بكتيريا *E.coli* O157:H7 وحدها في درجتي 37°م والشاهد 2 بتنمية بكتيريا *E.coli* O157:H7 على الدرجة 4°م دون أي إضافات. وتمثل الجدول (1) النتائج متوسط أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 باستخدام ثلاثة مكررات لكل تجربة.

الجدول (1) متوسط أعداد *E.coli* O157:H7 في اللبن المصنع بوجود بادئ مختلط والتخزين في درجتي الحرارة 37°م و4°م.

الزمن (ساعة)		العينات المضاف إليها بادئ مختلط في الدرجة 37°م	الشاهد1 في درجة 37°م (دون بادئ)	العينات المضاف إليها بادئ مختلط في الدرجة 4°م	الشاهد 2 في درجة 4°م (دون بادئ)
0	الأعداد	6×10^{1} - 5×10^{1}	6×10^{1}- 5×10^{1}	6×10^{1}- 5×10^{1}	6×10^{1} - 5×10^{1}
	pH	6.8	6.8	6.8	6.8
6	الأعداد	7×10^{1} - 6×10^{1}	7×10^{1} - 6×10^{1}	7×10^{1} - 6×10^{1}	7×10^{1} - 6×10^{1}
	pH	6.5	6.5	6.5	6.5
12	الأعداد	6×10^{1} - 5×10^{1}	7×10^{1}- 6×10^{1}	6×10^{1}- 5×10^{1}	7×10^{1} - 6×10^{1}
	pH	6	5.4	5.8	6.2
24	الأعداد	5×10^{1} - 4×10^{1}	7×10^{1}- 6×10^{1}	5×10^{1}- 4×10^{1}	8×10^{1} - 7×10^{1}
	pH	5.4	5.4	5.4	5.8
48	الأعداد	-	6×10^{1} - 5×10^{1}	4×10^{1} - 3×10^{1}	6×10^{1} - 5×10^{1}
	pH	4.2	5	5.1	5.5
72	الأعداد	-	6×10^{1} – 5×10^{1}	3×10^{1}- 2×10^{1}	6×10^{1} - 5×10^{1}
	pH	3.8	5	4.4	5.2
98	الأعداد	-	6×10^{1} – 5×10^{1}	-	6×10^{1} - 5×10^{1}
	pH	3.3	5	4	5

نلاحظ من دراسة نمو البكتيريا ضمن تجارب اللبن في الجدول السابق ارتفاعاً في أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 مع مرور 6 ساعات لتعود للانخفاض بعد ذلك تبعاً للزمن. ربما يعود ذلك إلى سرعة نمو بكتيريا *E.coli* O157:H7 وتكيفها في الوسط مقارنة ببكتيريا حمض اللبن إذ تحتاج هذه الأخيرة إلى مدة زمنية للتكيف في الوسط قبل نشاطها ونموها فيه، هذه الحاجة للتكيف متزامنة مع وجود أعداد من بكتيريا *E.coli* O157:H7 سببت تأخراً في إحداث تكون للخثرة استمر حتى 6 ساعات. كما يلاحظ أن درجة pH اللبن الناتج عن التخزين في الدرجة 37°م وصلت حتى 3.8 بعد 72 ساعة من التجربة، ويعود ذلك ليس فقط إلى نشاط بكتيريا البادئ بل أيضاً إلى مقدرة بكتيريا *E.coli* O157:H7 نفسها على خفض درجة pH الوسط كما ذكر العالم Massa وزملاؤه عام 1997 نظراً إلى قدرتها على تخمير اللاكتوز منتجة أحماضاً عضويةً، وقد ثبط نموها بعد 48 ساعة عند التخزين على درجة 37°م وبعد 98 ساعة عند التخزين في 4°م، وربما يعود ذلك إلى انخفاض درجة الـ pH إلى أقل من 4.4 في كلتا الحالتين. ومن تجربتي الشاهد 1 و2 يلاحظ أن أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 في الدرجة 37°م والدرجة 4°م التي جرت دون أية إضافة استمرت بأعداد لا يقل عن 1×10^{5} - 1×10^{6} خلية/مل، وهذا يدل على عدم وجود أية مادة مثبطة لنموها في الحليب المستخدم في التجارب فضلاً عن عدم وصول درجة الـpH إلى الحدود الدنيا المتحملة من قبلها وهي 4.4.

تبين نتائج الجدول (2) متوسط أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H باستخدام بكتيريا *Lb.bulgaricus* كبادئ مفرد في تصنيع اللبن بدءاً من حليب خالي الدسم معقم وملقح ببكتيريا *E.coli* O157:H7 بأعداد $10^5 - 10^6$ خلية/مل إذ حضن في الدرجة 42°م مدة أربع ساعات، ثم خُزن المزيج على الدرجة 37°م مدة 72 ساعة (تجربة 1)، وخُزن في الدرجة 4°م مدة 98 ساعة (تجربة 2)، فضلاً عن نتائج الشاهد 1 بتنمية بكتيريا *E.coli* O157:H7 وحدها في درجتي 37°م والشاهد 2 بتنمية بكتيريا *E.coli* O157:H7 في الدرجة 4°م دون أي إضافات.

الجدول (2) متوسط أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 في اللبن المصنع بوجود *Lb.bulgaricus* كبادئ مفرد بالتخزين في درجتي الحرارة 37°م و4°م.

الزمن (ساعة)		متوسط أعداد *E.coli* O157:H7 في الدرجة 37°م	الشاهد1 البكتيريا وحدها بدرجة 37°م	متوسط أعداد *E.coli* O157:H7 في الدرجة 4°م	الشاهد 2 البكتيريا وحدها بدرجة 4°م
0	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^5$	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^5$
	pH	6.8	6.8	6.8	6.8
6	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^7$
	pH	6.1	6.5	6.3	6.5
12	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^5$	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^5$	$10\times1 - 10\times1^6$
	pH	5.8	5.4	5	6.2
24	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^4$	$10\times1 - 10\times1^6$	$10\times1 - 10\times1^5$	$10\times1 - 10\times1^7$
	pH	4.2	5.4	5.4	5.8
48	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^4$	$10\times1 - 10\times1^5$	$10\times1 - 10\times1^3$	$10\times1 - 10\times1^5$
	pH	5.2	5	4.8	5.5
72	الأعداد	-	$10\times1 - 10\times1^5$	$10\times1 - 10\times1^2$	$10\times1 - 10\times1^5$
	pH	4	5	4.3	5.2
98	الأعداد	-	$10\times1 - 10\times1^5$	-	$10\times1 - 10\times1^5$
	pH	3.8	5	4	5.2

من الجدول (2) نلاحظ انخفاضاً تدريجياً لأعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 بوجود *Lb.bulgaricus* لينعدم وجودها بعد مرور 72 ساعة عند التخزين في 37°م كما انعدم وجودها في درجة حرارة 4°م بعد مرور 98 ساعة، ربما يعود ذلك إلى انخفاض درجة الـ pH في كلتا التجربتين إلى أقل من 4.4، ولا يوجد في الحليب المستعمل أي مواد أدت إلى تثبيط نمو بكتيريا *E.coli* O157:H7 نظراً إلى أنّها بقيت على قيد الحياة بعد انتهاء مدة التخزين، وهي 98 ساعة في كل من تجربتي الشاهد 1 و2.

يعرض الجدول (3) تغير أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 مع الزمن إذ لُقّح الحليب المعد لتصنيع اللبن ببكتيريا *E.coli* O157:H7 بأعداد $10\times1^5 - 10\times1^6$ خلية /مل بوجود بادئ مفرد من *Str.thermophilus*. وحضن على الدرجة 42°م مدة أربع ساعات ثم خزن المزيج على الدرجة 37°م و4°م مدة 98 ساعة.

الجدول (3) متوسط أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 في اللبن المصنع بوجود بادئ *Str.thermophilus* كبادئ مفرد بالتخزين في درجتي 37°م و4°م.

الزمن (ساعة)		متوسط أعداد *E.coli* O157:H7 في الدرجة 37°م	الشاهد1 البكتيريا وحدها بدرجة 37°م	متوسط أعداد *E.coli* O157:H7 في الدرجة4°م	الشاهد 2 البكتيريا وحدها بدرجة 4°م
0	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$
	pH	6.8	6.8	6.8	6.8
6	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^{6}$	$10\times1 - 10\times1^{6}$	$10\times1 - 10\times1^{6}$	$10\times1 - 10\times1^{7}$
	pH	5.8	5.6	5.6	6.5
12	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{6}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{6}$
	pH	5.5	5.4	5.4	6.2
24	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^{4}$	$10\times1 - 10\times1^{6}$	$10\times1 - 10\times1^{4}$	$10\times1 - 10\times1^{7}$
	pH	5	5.4	5.1	5.8
48	الأعداد	$10\times1 - 10\times1^{3}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{3}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$
	pH	4.5	5	4.8	5.5
72	الأعداد	-	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{2}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$
	pH	4	5	4.5	5.2
98	الأعداد	-	$10\times1 - 10\times1^{5}$	20 <	$10\times1 - 10\times1^{5}$
	pH	3.8	5	4.2	5.2

من دراسة الجدول (3) نلاحظ انخفاض أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 تدريجياً بوجود بادئ *Str.thermophilus* كبادئ مفرد عند التخزين في الدرجة 37°م لينعدم وجودها بعد مرور 72 ساعة بدرجة pH تساوي 4، ولم يلاحظ انعدام وجود البكتيريا في الدرجة 4°م في نهاية مدة التجربة أي بعد 98 ساعة، وهذا يتوافق مع دراسة Hudson وزملائه عام 1997.

ويوضح الجدول (4) تجربة الشاهد الثالثة إذْ حمض الحليب المعقم الخالي الدسم بتراكيز من حمض اللبن للوصول إلى درجات pH مختلفة.

الجدول (4) تجربة الشاهد 3 باستخدام 10 % حمض اللبن لتحميض الوسط

درجة pH	6.6	5.2	4.5	4	3.5	3.2	2.8
***E.coli* O157:H7 (خلية/مل)**	$10\times1 - 10\times1^{6}$	$10\times1 - 10\times1^{5}$	$10\times1 - 10\times1^{3}$	0	0	0	0

لوحظ انعدام وجود بكتيريا *E.coli* O157:H7 عند درجة pH أقل من 4.5، وهذا يتوافق مع نتائج دراستنا السابقة في الجدول 1 و2 و3 حيث انعدم وجودها عند pH أقل من 4.4 في الحالات كلّها. ولم يكن هناك تأثير يذكر لدرجة حرارة التخزين في بقاء بكتيريا *E.coli* O157:H7 نظراً إلى أنها وحسب دراسات عديدة تستطيع البقاء على قيد

الحياة في درجات حرارة أقل من 6°م، خصوصاً في حال كانت المادة الغذائية ملوثة بها قبل التعرض لهذه الحرارة، إلاّ أنها لا تتمكن من النمو في هذه الدرجة من الحرارة، وهذا ما أكدته دراستنا في الشاهد 1 و2 من كل اختبار، وهذا يتوافق مع (Evrendilek, 2007)؛ (Issa and Ryser, 2000).

درس التحليل الإحصائي باستخدام برنامج SPSS، بطريقة القطاعات العشوائية بالاعتماد على ثلاثة عوامل وثلاثة مكررات، العامل الأول A هو نوع بكتيريا حمض اللبن المستخدمة كبادئ في تصنيع اللبن (البادئ المزدوج 1:1، *Lb. bulgaricus* كبادئ مفرد أو *Stre.thermophilus* كبادئ مفرد)، والعامل الثاني B هو درجة حرارة التخزين (4°م – 37°م)، والعامل الثالث C هي المدة الزمنية التي أخذت بها القراءة (0، 6، 12، 24، 48، 72 أو 98 ساعة)، وتعبر المكررات عن أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7 خلال التجربة، كما هو موضح في الجدول (5).

الجدول (5) جدول تحليل التباين

مصادر التباين	درجة الحرية	مجموع مربع الانحرافات	متوسط مجموع مربع الانحرافات	Fم	مستوى الدلالة	LSD 5%
A	6	4.829E14	8.049E13	42.49	**	57.63
B	2	4.333E10	2.167E10	1.092	**	
C	1	1.279E10	1.279E10	0.672		
A*C	6	1.270E11	2.117E10	1.082	**	1.953
B *A	12	2.300E11	1.917E10	0.976		
C* B	2	3.476E10	1.738E10	0.4		
C* B* A	12	2.386E11	1.988E10	1.98	**	1.23
الخطأ التجريبي	72	6.131E14				

علماً أن A: المدة الزمنية ، B: البادئ المستخدم ، C: حرارة التخزين.

وجدت الدراسة الإحصائية فروقاً معنويةً بين المدد الزمنية السبع التي جرت خلالها التجربة، وكانت أفضل المدد المدة السابعة، وأفضل البادئات المستخدمة هو البادئ المزدوج يليه بادئ *Lb. bulgaricus* المفرد يليها بادئ *Str. thermophilus* المفرد بالتأثير في خفض أعداد بكتيريا *E.coli* O157:H7. ولم تجد الدراسة أي فرق معنوي في التأثير في أعداد البكتيريا بوجود درجتي حرارة تخزين مختلفة 4°م و37°م، وهذه الفروق هي فروق ظاهرية، وهذا يتوافق ويدعم نتائج تجاربنا في هذا البحث. وعند دراسة التفاعل بين العوامل المدروسة كالتفاعل بين نوعية البادئ المستخدم ودرجة حرارة التخزين خلال التجربة وجدت فروق معنوية، وبلغت قيمة LSD 1.23.

الاستنتاجات

1- إن اللبن السوري المصنع باستخدام البادئ المختلط المؤلـف مـن *Lb. bulgaricus* و*Str.thermophilus* يكون ضمان له من عدم وجود بكتيريـا *E. coli O157:H7* فيه حتى ولو تم التلوث بها بعد التصنيع بشرط أن يكون اللبن مكتمل التخمر ومخزنـاً مدة لا تقل عن ثلاثة أيام.

2- إن البادئ المزدوج المؤلف من *Lb. bulgaricus* و*Str.thermophilus* معـاً لـه فعالية أقوى ضد *E. coli* O157:H7 من استعمال كل بادئ وحده في التصنيع.

3- إن بادئ *Lb. bulgaricus* له فعالية تثبيطية علـى *E. coli O157:H7* فيمـا لـو استعمل وحده كبادئ أكثر من *Str.thermophilus*.

4- يرجع انخفاض أعداد بكتيريا *E. coli O157:H7* بشكل رئيسي إلى انخفـاض فـي درجة الـ pH إلى أقل من 4.4، ولم يلاحظ وجود مواد مثبطة لنموها فـي الحليـب المستخدم في التجربة.

REFERENSES المراجع

Arocha, M. M., McVey M., Loder S. D., Rupnow J. H., and Bullerman L. (1991). The behavior of hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of cottage cheese. J. Food Prot. 55:379–381.

Barefoot, S. F., and Nettles C. G. (1993). Antibiosis revisited: bacteriocins produced by Dairy Starter cultures. *J. Dairy Sci.* 76:2366 – 2379.

Borczyk, A. A., Karmali, M. A., Lior, H., Duncan, L. M. C. (1987). "Bovine reservoir for verotoxin-producing Escherichia coli O157: H7" Lancet. 1: 98-99.

Brashears, M. M., and Durre W. A.. 1999. Inhibitory action of *Lactobacillus lactis* towards *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. J. Food Prot. 62:1336–1340.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). (2008). *Escherichia coli* O157:H7 " www.cdc.gov

Dineen, S. S., Tackeuchi, K., Soudah, I. E., & Boor, K. I. (1998). "Persistence of E. coli 157:H7 in dairy fermentation systems". Journal of Food Protection, 61, 1602–1608.

Doyle, M. P. (1991). "Escherichia coli O157: H7 and its significance in foods" Int. J. Food Microbiol., 12: 289-301.

Doyle, M. P., Zhao, T., Meng, J. and Zhao, S. (1997). *Escherichia coli* O157:H7. In Food Microbiology: fundamentals and frontiers, (Eds) Doyle, M. P., Beuchat, L. R. and Montville, T. D. pp171-191. ASM Press, Washington, D.C., USA.

Evrendilek G. A. (2007). "Survival of Escherichia coli O157:H7 in yogurt drink, plain yogurt and salted (tuzlu) yogurt: Effects of storage time, temperature, background flora and product characteristics" International Journal of Dairy Technology 60 (2):118 – 122.

Hovde, C. J., Austin, P. R., Cloud, K. A., Williams, C. J., Hunt, C. W. (1999). Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3233–3235.

Hudson, L. M., Chen, J., Hill, A. R., and Griffiths, M. W. (1997). Bioluminescence a rapid indicator of E. coli O157:H7 in selected yoghurt and cheese varieties. Journal of Food Protection, 60, 891–897

Issa, M. S., Ryser, E. T. (2000). "Fate of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurum DT 104* and *Escherichia coli O157:H7* in Labneh and Postferment Ation Contaninant " Int. of Food Protection .63 (5): 608-612.

Janes, M. E., Cobbs, T., Kooshesh, S., Johnson, M. G. (2002). Survival differences of Escherichia coli O157:H7 strains in apples of three varieties stored at various temperatures. J. Food Prot. 65, 1075–1080.

Jarret D. S., Skandamis P. N., Geornaras I., and J. N. Sofos. (2007). "Acid tolerance of acid-adapted and nonacid-adapted Escherichia coli O157:H7 strains in beef decontamination runoff fluids or on beef tissue" Food Microbiology 24 :530–538

Kim, J., Nietfeldt, J., and Benson, A. K. (1999). "Octamer-based genome scanning distinguishes a unique subpopulation of Escherichia coli O157:H7 strains in cattle" Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13288–13293.

Massa, S., Altieri, C., Quaranta, V. and De Pace, R. (1997). "Survival of *Escherichia coli* O157: H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C "Letters in Applied Microbiology. 24(5): 347-350

Mermelstein, N. H. (1993). "Controlling E.coli O157:H7 in meat" Food Technol. 47:90-91.

Reitsma, C. J., and Henning R. D. (1996). "Survival of enterohemmorrhagic *Escherichia coli* 1057:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese" J. Food Prot. 59:460–464.

Simesk B., Sagdic O., and Ozcelik S. (2007). "Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage of Ayran produced with different spices" Journal of Food Engineering78(2), 676-680

Scott, T., Wilson, C., Bailey, D., Klopfenstein, T., Milton, T., Moxley, R., Smith, D., Gray, J., Hungerford, L. (2000). "Influence of diet on total and acid resistant *E. coli* and colonic pH" Nebraska Beef Report, 39–41.

Smith L., Mann J. E., Harris K., Miller M. F., and Bashears M. M. (2005). "Copyright Q, International Association for Food Protection Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella in Ground Beef Using Lactic Acid Bacteria and the Impact on Sensory Properties" Journal of Food Protection, 68(8): 1587–1592

Tosun H., Kun A. K., and Aktuu P. (2007). "Acid Adaptation Effect on Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Fermented Milk Products" Turk. J. Vet. Anim. Sci. 31(1): 61-66

Vialette M, Pinon A, Chasseignaux E, and Lange M. (2003). "Growths kinetics comparison of clinical and seafood Listeria monocytogenes isolates in acid and osmotic environment" Int J Food Microbiol .82:121–131.

Received	**2011/02/16**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2011/10/18**	**قبول البحث للنشر**