تأثير إضافة حمض السوربيك وحمض الخليك على الايشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في اللحوم الحمراء والبيضاء

عمار حاجي العلي[1] ،عبد العزيز عروانه[2] ، غياث سليمان[3]

قسم الصحة العامة والطب الوقائي، كلية الطب البيطري ،جامعة حماة، سوريا[1]

قسم الصحة العامة والطب الوقائي، كلية الطب البيطري ،جامعة حماة، سوريا[2]

كلية الطب البشري ، قسم طب الأسرة والمجتمع، جامعة طرطوس، سوريا[3]

الملخص

هدف البحث إلى دراسة تأثير حمض السوربيك وحمض الخليك على جراثيم والاشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في اللحوم الحمراء والبيضاء والتي تعد من المسببات الرئيسية لبعض الأمراض المنقولة عن طريق اللحوم وتساهم بشكل كبير في فساد اللحوم وذلك بهدف تثبيط نمو هذه الجراثيم عند الحد المسموح به. حيث تم غمر عينات اللحم بمحلول حمض السوربيك: حمض السوربيك1%، حمض السوربيك2% ، ومحلول حمض الخليك تركيز 1% وتركيز 2% مدة 30 دقيقة. ثم دُرس تأثير حمض السوربيك بالتركيزيين المختلفين على هذه اللحوم وقد تم تقييم النتائج بعد إجراء الاختبار على عدد الجراثيم في اللحوم. وقد بيّنت النتائج قدرة حمض السوربيك على تثبيط نمو هذه الجراثيم. وقد أظهرت العينات المعاملة بمحلول حمض السوربيك 2% تثبيط أفضل في هذه اللحوم أما بالنسبة لحمض الخليك تركيز 1% وتركيز، 2% فقد قضى على نمو الاشريكية ونستنتج من هذه الدراسة أن إضافة حمض السوربيك بتركيز 2% يمكن أن يخفض من عدد هذه الجراثيم بينما حمض الخليك قضى على نمو الايشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو وبينت النتائج وجود فروقات معنوية عند $P<0.05$.

الكلمات المفتاحية : اللحوم الحمراء – الحوم البيضاء – حمض السوربيك – حمض الخليك – الايشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو.

Effect of sorbic acid addition on Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) in red and white meat

Ammar Haji Al-Ali* **Abdul Aziz Arawneh** **Ghiyath Soliman**

* PhD student in the Department of Public Health and Preventive Medicine, specializing in Meat Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Medicine, Hama University, ammmmar19994@gmail.com.

Abstract

The aim of this research was to study the effect of sorbic acid and acetic acid on Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) in red and white meat, which is one of the main causes of some meat-borne diseases and contributes significantly to meat spoilage. The aim was to inhibit the growth of these bacteria within the permissible limits. Meat samples were immersed in sorbic acid solutions: 1% sorbic acid, 2% sorbic acid, and 1% and 2% acetic acid solutions for 30 minutes. The effect of sorbic acid at the two different concentrations on these meats was then studied. The results were evaluated after conducting a test on the number of bacteria in the meat. The results demonstrated the ability of sorbic acid to inhibit the growth of these bacteria. Samples treated with 2% sorbic acid solution showed better inhibition in these meats, while 1% and 2% acetic acid eliminated the growth of E. coli. We conclude from this study that adding 2% sorbic acid can reduce the number of these bacteria, while acetic acid eliminated the growth of Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) . The results showed significant differences at $P<0.05$.

Keywords: Red meat - White meat - Sorbic acid - Acetic acid - Verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC)

المقدمة :

تعد اللحوم من أهم مصادر البروتين الأساسية والأحماض الأمينية والدهنية والفيتامينات والمعادن الضرورية لحياة الإنسان(Vasut and Robeci, 2009).

ونظراً لقيمتها الغذائية العالية فإنها تشكل بيئة ملائمة لنمو وتكاثر الجراثيم حيث أنها يمكن أن تتلوث بسهولة بالجراثيم الممرضة من شتى مصادر التلوث بدئاً من الحيوان المذبوح وصولاً إلى عرضها في الأسواق (Lawrie, 1985)، إن قضية تلوث اللحوم بمسببات الأمراض مثيرة للقلق نظراً لارتفاع معدل استهلاكها وتلوثها في الوقت نفسه، حيث تعدَ اللحوم أحد أهم الأغذية المسببة لحالات التسمم، وتنقل العديد من الأمراض المحمولة على الغذاء (Bhandare *et al*., 2007) ، وقد تم تقدير عدد الإصابات التي انتقلت عن طريق تناول اللحوم في كل سنة إلى نحو600 مليون حالة، يموت منهم420 ألف شخص من بينهم 125 ألف طفل دون سن الخامسة وفق تقديرات منظمة الصحة العالمية (WHO, 2015).

تعد الإشريكية القولونية نوعاً واسع الانتشار حيث توجد هذه الجراثيم بأعداد وافرة في أمعاء الإنسان والحيوان إذ أن أعدادها قد تصل إلى (910) خلية لكل غرام في عينة البراز، وبالتالي فهي تتواجد في مياه الصرف الصحي، ومياه الفضلات المعالجة، وفي كل المياه الطبيعية والترب الملوثة ببراز مصدره الإنسان والحيوانات لذلك تم تعريفها بأنها دليل للتلوث البرازي في الأغذية والمشروبات (Bruyand *et al*., 2018)

وتسبب الاشريكية القولونية العديد من حالات التسمم الغذائي المرتبطة لدى تناول اللحوم غير المطهية جيداً، حيث تتواجد الإشريكية القولونية في البراز وأمعاء الحيوانات وجلودها وتلوث اللحوم في أثناء عملية الذبح او وجودها في ادوات الذبح ومياه التنظيف (Duffy *et al* ., 2003).

ولضرورة الحفاظ على اللحوم من مسببات الفساد يمكن استخدام بعض المواد الحافظة مثل حمض السوربيك وحمض الخليك كمواد مثبطة وقاتلة للجراثيم، حيث يعتبر حمض السوربيك مركب آمن ويُستخدم على نطاق واسع كعوامل مضادة للميكروبات في الأغذية (Campos)

and Gerschenson, 1998. ويعتبر سوربات البوتاسيوم هو الشكل الأكثر استخدامًا في صناعة الأغذية نظرًا لثباته وسهولة تصنيعه وذوبانه الاستثنائي في الماء (Lueck,1990). أما في الزيوت يكون حمض السوربيك أكثر قابلية للذوبان من سوربات البوتاسيوم (Thakur *et al.*, 1994). ويملك حمض السوربيك واملاحه فعالية واسعة الطيف ضد الفطور والجراثيم ، ويمكن أن يستخدم حمض السوربيك مع كميات صغيرة من النتريت أو الفوسفات في بعض منتجات اللحوم، ويمكن استخدام حمض السوربيك حتى تركيز 5% في حفظ اللحوم من أجل القضاء على مسببات الفساد الجرثومية الهوائية (Feiner, 2006) وقد ثبت استخدامه وفعاليته ضد جراثيم الايشريكية القولونية (Koodie and Dhople, 2001)

ومن هذه المواد المستخدمة في حفظ اللحوم أيضاً حمض الخليك أو مايعرف باسم حمض الخل أو حمض الاستيك (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2010)ويعتبر من الكواشف الكيميائية الهامة ويستخدم كمادة حافظة وله تأثير فعال ضد الاحياء الدقيقة المجهرية بسبب قدرته على خفض PH والتأثير على ثباتية الاغشية الخارجية للخلية البكتيرية ، فقد تبين أن فعالية الأحماض العضوية في إطالة مدة حفظ اللحوم له تأثير كبير في خفض الحمولة الجرثومية في اللحوم (Luck and Jager, 1998) فقد تبين ان معاملة ذبائح الحيوانات بحمض الخل قد تخفض تعداد جراثيم الايشريكية القولونية o157:H7 بمقدار يتراوح من 0.1-4.67 log CFU/g (Stivarius and Pohlman, 2002)

ومن الجدير بالذكر ان منظمة الأغذية والأدوية الأمريكية تسمح باستخدام الاحماض العضوية بنسبة تتراوح من 1.5-2.5% كمحاليل مطهرة لذبائح الدواجن (Del Rio and Panizo-Moran, 2007).

الهدف من البحث:

دراسة تأثير حمض السوربيك وحمض الخليك بتراكيز 1%، 2%على الايشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في اللحوم الحمراء والبيضاء.

المواد وطرائق العمل Material and Methods:

أجريت هذه الدراســـة في مخبر الأحياء الدقيقة ومخبر اللحوم في كلية الطب البيطري التابعة لجامعة حماه وكانت التجربة على الشكل التالي :

حيث تم إجراء تقييم تأثير حمض الســـوربيك وحمض الخليك على مجموعة من اللحوم الحمراء والبيضاء المستهلكة في الأسواق المحلية ومقسمة على الشكل التالي:

لحوم الأغنام و لحوم أبقار ولحوم ماعز ولحوم جمال ولحوم فروج بالإضافة إلى لحوم أسماك

عدوى اللحوم بجراثيم الإشريكية القولونية:

تم عزل الإيشـريكية القولونية المنتجة للذيفان الســام لخلايا فيرو من اللحوم المباعة في الأسـواق المحلية لمدينة حماة وتم الكشــف عن جينات vt1, vt2 باســتخدام جهاز PCR وإجراء عدوى صـنعية في اللحوم المدروسـة وذلك عن طريق تنشيط جراثيم الإشـريكية القولونية على وسـط نقيع القلب والدماغ وحضـنها عند 37°م لمدة 18–24 سـاعة ، ثم تم تعليق الجراثيم في سـائل يحتوي محلول فيزيولوجي كـافي لإجراء العـدوى في اللحوم، وبعـدهـا تم غمر أنواع اللحوم بـالمعلق الجرثومي كل على حدة .

الكشف عن التعداد الأولي للجراثيم:

تمَّ نقل 10 غرام من كل عينة إلى كيس معقم يحتوي 90 مل من ماء الببتون وبعدها تم مجانسـة العينة باسـتخدام جهاز المجانســة Stomacher مدة دقيقتين ثم أجريت سـلســة من التخفيفات العشـرية من أجل إجراء التعداد الجرثومي، وتم استخدام وسـط آغار EMB وحضـنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 سـاعة وتم عد المسـتعمرات الخضـراء ذات اللمعة السـوداء المعدنية (Hausler,1972; Cheesbrough, 1985).

تأثير الأحماض المختلفة على جراثيم الإشريكية القولونية:

تم أخذ 150 غرام من كل نوع من اللحوم وقطعت الى قطع حســـب كل نوع من اللحوم وغمرت معاملات اللحوم المختلفة بالمعلق الجرثومي لمدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم تم إخراجها (Goodridge *et al.*, 1999). وكان توزيع المعاملات كما هو موضح في الجدول (1):

جدول رقم (1): يوضح توزيع عينات اللحوم ومعاملتها بالأحماض

العينات التجريبية	عدد العينات و تركيز المواد الحافظة	
لحم أغنام	6 عينات ب حمض الخليك 1%	6 عينات ب حمض الخليك 2%
	6 عينات ب حمض السوربيك 1%	6 عينات ب حمض السوربيك 2%
لحم أبقار	6 عينات ب حمض الخليك 1%	6 عينات ب حمض الخليك 2%
	6 عينات ب حمض السوربيك 1%	6 عينات ب حمض السوربيك 2%
لحم ماعز	6 عينات ب حمض الخليك 1%	6 عينات ب حمض الخليك 2%
	6 عينات ب حمض السوربيك 1%	6 عينات ب حمض السوربيك 2%
لحم جمال	6 عينات ب حمض الخليك 1%	6 عينات ب حمض الخليك 2%
	6 عينات ب حمض السوربيك 1%	6 عينات ب حمض السوربيك 2%
لحم فروج	6 عينات ب حمض الخليك 1%	6 عينات ب حمض الخليك 2%
	6 عينات ب حمض السوربيك 1%	6 عينات ب حمض السوربيك 2%
لحم أسماك	6 عينات ب حمض الخليك 1%	6 عينات ب حمض الخليك 2%
	6 عينات ب حمض السوربيك 1%	6 عينات ب حمض السوربيك 2%

الكشف عن تأثير الأحماض على جراثيم الإشريكية القولونية:

تمَّ نقل 10 غرام من كل عينة إلى كيس معقم يحتوي 90 مل من ماء الببتون وبعدها تم مجانسة العينة باستخدام جهاز المجانسة Stomacher مدة دقيقتين ثم أجريت سلسة من التخفيفات العشرية من أجل إجراء التعداد الجرثومي، وتم استخدام وسط آغار EMB

وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة وتم عد المستعمرات الخضراء ذات اللمعة السوداء المعدنية وُحسَب عدد المستعمرات النامية واستخرج عدد جراثيم الإشريكية القولونية الملوثة للعينات من عدد المستعمرات في الاطباق مضروباً بمقلوب التخفيف ويقاس بواحدة CFU(وحدة مشكلة للمستعمرة Colony- forming unit)

واختبرت الاطباق التي يتراوح عدد مستعمراتها بين 30-300 مستعمرة (Hausler, 1972; Cheesbrough, 1985).

التحليل الإحصائي:

تم استخدام برنامج (Microsoft Excel 2010) في حساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري وإجراء الرسوم البيانية، وتم استخدام اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه One Way ANOVA في البرنامج الإحصائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند مستوى p ≤ 0.05.

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج هذه الدراسة قدرة الحموض العضوية المدروسة على التخفيف من الحمولة الجرثومية من جراثيم الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو، حيث تبين تفوق حمض الخليك على حمض السوربيك في القضاء على الجراثيم في مختلف معاملات اللحوم كما هو موضح في الجدول رقم (2)

الجدول رقم (2): تعداد الجراثيم بعد تطبيق الأحماض على اللحوم المدروسة $\log_{10}$/ g

نوع اللحم	التركيز	العدد	المتوسط الحسابي	الانحراف المعياري	أصغر قيمة	أكبر قيمة
أغنام	سوربيك 1%	6	2.35^{a}	0.20	2.11	2.56
	سوربيك 2%	6	2.12^{b}	0.14	2.01	2.37
	خليك 1%	6	0.00^{c}	0.00	0.00	0.00
	خليك 2%	6	0.00^{c}	0.00	0.00	0.00
أبقار	سوربيك 1%	6	2.20^{a}	0.15	2.05	2.41
	سوربيك 2%	6	2.15^{a}	0.15	2.02	2.37
	خليك 1%	6	0.00^{b}	0.00	0.00	0.00
	خليك 2%	6	0.00^{b}	0.00	0.00	0.00
ماعز	سوربيك 1%	6	2.24^{b}	0.12	2.13	2.37
	سوربيك 2%	6	2.21^{b}	0.12	2.09	2.37
	خليك 1%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00
	خليك 2%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00
جمال	سوربيك 1%	6	2.29^{b}	0.23	2.05	2.54
	سوربيك 2%	6	2.29^{b}	0.19	2.09	2.56
	خليك 1%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00
	خليك 2%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00
فروج	سوربيك 1%	6	2.21^{b}	0.18	2.01	2.43
	سوربيك 2%	6	2.25^{b}	0.21	2.05	2.45
	خليك 1%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00

	خليك 2%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00
سمك	سوربيك 1%	6	2.16^{b}	0.14	2.01	2.37
	سوربيك 2%	6	2.22^{b}	0.10	2.06	2.33
	خليك 1%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00
	خليك 2%	6	0.00^{a}	0.00	0.00	0.00

تدل الرموز a ,b ,c على وجود فروقات معنوية في حال اختلافها ضـــمن نفس العمود ونفس الزمن عند مقارنة المتوسطات الحسابية ما بين مجموعات الدراسة باستخدام اختبار تحليل التباين وحيد الاتجاه One Way ANOVA في البرنامج الإحصـــائي SPSS 20 حيث اعتبرت الفروقات معنوية عند $P<0.05$.

وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة نجد أنها توافق ما وجده (Enkhbold et *al.,* 2022) في اللحوم حيث خفضـت سـوربات البوتاسـيوم من عدد الإيشـريكية القولونية بتراكيز مختلفة 1% ، 2%، 5% .

وبينت نتائج تأثير حمض الخليك على الايشريكية القولونية انخفاض عدد جراثيم الايشريكية عند معاملتها بحمض الخليك بالتركيز 1% والتركيز 2% حيث يوافق دراسـة أجرتها (الابراهيم،2022) حيث وجدت أن إضـــافة حمض الخليك بتركيز 1% و تركيز 2% في لحوم الدجاج يمكن ان يخفض من أعداد الايشـريكية القولونية، وهذا يوافق دراسـة أجراها (Ahmed *et al.*, 2018) لتأثير حمض الخليك بتركيز 1 و2% على جراثيم الإشـــريكية الفقولونية كما وافقت نتائج هذه الدراسة ما وجده (Shaltout et al., 2014)

بـإضـــافـة تـأثير تركيزات مختلفـة من حمض الخليـك (1 و2%) يمكن أن يؤخر نمو جراثيم الايشريكية القولونية ولكن أظهرت دراسـة (Elaine and Catherine, 2000) مخالفة لنتائج هذه الدراسة حيث وجد أنه يمكن تتكيف E. coli O157: H7 مع الظروف الحمضية مما يؤثر سلبًا على فعالية غسيل الرش بحمض الخليك بنسبة 2 % في تقليل أعداد هذه الجراثيم في الذبائح .

الاستنتاجات:

نستنتج من الدراسة الحالية :

1- انخفاض تعداد الإشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في اللحوم الحمراء والبيضاء وذلك بعد تعرضها لحمض السوربيك.

2- أظهر حمض الخليك انعدام وجود جراثيم الايشـــريكية القولونية المنتجة للذيفان الســـام لخلايا فيرو في العينات المختبرة في التركيزين 1%، 2% .

التوصيات:

- التوسع في دراسة تأثير حمض السوربيك وحمض الخليك وذلك بتراكيز أعلى ومختلفة على جراثيم الايشريكية القولونية المنتجة للذيفان السام لخلايا فيرو في اللحوم.
- دراســة تأثير إضــافة حمض الســوربيك وحمض الخليك في اللحوم الحمراء والبيضــاء على جراثيم أخرى مثل المكورات العنقودية وغيرها من الجراثيم
- تكثيف الرقابة الصحية في أماكن بيع اللحوم ومراقبتها باستمرار للحد من الممارسات الخاطئة أثناء تداول اللحوم والمهددة للصحة العامة.
- إضـافة بند في لائحة الشـروط الصـحية للمذابح غمر او غسـل اللحوم بتراكيز مخفضـة من هذه الأحماض.

المراجعReferences :

الابراهيم نوفة ، نعمة فؤاد ، عراونة عبد العزيز 2022(دراســـة تأثير حمض الخل وحمض اللبن على بكتريا السالمونيلا والمكورات العنقودية الذهبية في لحم الدجاج خلال الحفظ بالتخزين المبرد) مجلة جامعة حلب ، سلسلة العلوم الزراعية، المجلد، (152).

1) Ahmed A. Shewail; Fahim A. Shaltout and Thabet M. Gerges, Álvarez-Ordóñez A, Fernández A, Bernardo A, López M. 2010. Acid tolerance in Salmonella Typhimurium induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures. Food Microbiol 27:44-49.
2) Bhandare SG, Sherikar AT, Paturkar AM et al. (2007) A comparison of microbial contamination on sheep/goat carcasses in a modern Indian abattoir and traditional meat shops. Food Control 18 (7): 854–858.
3) Campos, C.A. and Gerschenson, L.N. 1998. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against Staphylococcus aureus growth in laboratory medium. Int. Jour. Food Micro. 54:117-122.
4) Cheesbrough, M. (1985). Medical Laboratory Manual for Tropical Countries. 1st ed. English Language Book Society, London. p 400–480.
5) Del Rio, E. and M. Panizo-Moran. 2007. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. Intern. J. Food Microbio. 115: 286-280.
6) Elaine D. Berry and Catherine N. Cutter,2000 Effects of Acid Adaptation of Escherichia coli O157:H7 on Efficacy of Acetic Acid Spray Washes To Decontaminate Beef Carcass Tissue APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 2000, p. 1493–1498.
7) Feiner, Gerhard (2006):Meat Products Handbook ,Practical Science And Technology , Woodhead Publishing Limited , First Published ,U.S.A.
8) Goodridge, L., Chen, J., & Griffiths, M. (1999). The use of a fluorescent bacteriophage assay for detection of Escherichia coli O157:H7 in inoculated ground beef and raw milk. International Journal of Food Microbiology, 47 (1-2), 43-50.
9) Hausler, W.J.JR.(1972).Standard Methods for the Examination Diary Products .American Puplic Health Ass.,Washington.D.C.
10) Koodie L., Dhople A.M. (2001). Acid tolerance of Escherichia coli O157:H7 and its survival in apple juice. Microbios. 104: 167– 175.

11) Lawrie RA (1985) Meat science, 4th editio. Oxford: Pergamon Press.

12) Lueck, E. 1990. Food Applications of sorbic acid and its salts. Food Additives and Contaminants. 7:711−715.

13) Shaltout, F. A; Gerges, M. T. and Shewail, A. A 2014 mpact of organic acids and their salts on microbial quality and shelf life of beef meat Glob. J. Agric. Food Safety Sci., Vol.1 (2): pp. 360 – 370.

14) Stivarius M.R., Pohlman F.W., Mc Elyea K.S., Apple J.K., 2002. The effect of acetic acid, glucomic acid and trisodium citrate treatment of beef trimmings on microbial, color and odor characteristics of ground beef through similitude retail display. Meat Sci. 60, 245-252.

15) Thakur, B.R., Singh, R.K. and Arya, S.S. 1994. Chemistry of sorbates-a basic perspective. Food Reviews Int. 10:71-91.

16) Vasut RG, Robeci MD (2009) Food Contamination With Psyhcrophilic Bacteria. Lucr Ştiinţifice Med Vet XLII (2): 325–330.