تعداد بكتريا القولون في الجبن الطري المحلي في محافظة ديالى و تأثير أملاح الاستحلاب عليها

احمد محمد صالح و شكر محمود ياسين@ و رافد سمير عبدالكريم
فرع الصحة العامة البيطرية - كلية الطب البيطري- جامعة ديالى- العراق
shuker_ald@yahoo.com
قبل للنشر في 2012/11/28

الخلاصة

استهدفت التجربة دراسة درجة تلوث عينات الجبن الطري المنتج محليا في محافظة ديالى بأعداد بكتريا القولون لغرض تحديد نوعية أملاح الاستحلاب المنوذجية ونسبها الملائمة لاستحلاب الجبن الطري المحلي لصنع الجبن المطبوخ وتأثيرها في حمولته الجرثومية المؤثرة في الصحة العامة. جمعت بصورة عشوائية من أسواق خمسة أطراف شعبية لنواحي تابعة لقضاء بعقوبة في محافظة ديالى 60 عينة من الجبن الطري المحلي المنتج من قبل الفلاحين والبقالين وبمعدل 30 عينة لكل من الموسم الصيفي من بداية تموز إلى نهاية آب والموسم الشتوي من بداية كانون الأول إلى نهاية كانون الثاني لدراسة حمولتها الجرثومية من بكتريا القولون والايشريكيا القولونية . وتميز العد الجرثومي الكلي بالارتفاع العالي والمعنوي على مستوى (P<0.01) في عينات الجبن المحلي للموسم الصيفي والشتوي . أثبتت النتائج التأثير القاتل أو المثبط لنشاط البكتريا بواسطة أملاح الاستحلاب المستخدمة في عملية طبخ الجبن الطري المحلي حيث انخفض معدل العد الجرثومي الكلي في الجبن المطبوخ بفرق عالي المعنوية (P<0.01) بعد إضافة وخلط 2.5% من أملاح الاستحلاب مع الجبن الطري المحلي المثروم مباشرة قبل عملية الطبخ . وانعدم نمو الايشريكيا القولونية بعد إضافة 2% من أملاح الاستحلاب إلى المرق المغذي لنمو الجراثيم , تؤكد النتائج أن أفضل خلطة لمكونات أملاح الاستحلاب الجبن الطري المحلي هي التي تتكون من 90% الفوسفات المتعدد الثلاثي الصوديوم + 10% سترات ثلاثي الصوديوم.

الكلمات المفتاحية : بكتريا القولون ,الجبن الطري , التسمم الغذائي, املاح الاستحلاب.

المقدمة

انتشرت الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان بشكل واسع في مختلف بلدان العالم , ولمنتجات الحيوان تأثيرا مهما في انتقال هذة الأمراض للإنسان وللجبن الطري المصنع في منازل مربي الحيوانات من الحليب الخام دورا كبيرا في نقل العديد من المسببات المرضية للإنسان بسبب ارتفاع حمولته الجرثومية الناتجة عن عدم استخدام المعاملات الحرارية الكافية للقضاء على الجراثيم المرضية المتواجدة في الحليب المعد للتصنيع وكذلك عن التلوث الحاصل بسبب الطرق البدائية المتبعة أثناء الإنتاج والنقل والتداول وعلى هذا الأساس وبسبب افتقار مثل هذا الجبن للشروط الصحية فان لتحديد نوعية أملاح الاستحلاب النموذجية ونسبها الملائمة لاستحلاب الجبن الطري المصنع محليا يؤدي إلى القضاء على الجراثيم المرضية التي تتواجد فيها والى اختزال حمولته الجرثومية التي لها دور كبير في نوعيتها وإطالة مدة صلاحية هذا الجبن للاستهلاك (1و2) لتسليط الضوء على دور تلوث الحليب بصورة عامة ومنتجات الجبن المنتجة محليا بصورة خاصة في وبائية بكتريا القولون وجراثيم الأيشريكيا القولونية وعلاقتها بالصحة العامة للمستهلك وحيث أثبتت الدراسات أن الأبقار تعد المستودع الرئيسي لهذه الجراثيم(3 - 6). لقد حدد الجهاز المركزي العراقي للتقييس والسيطرة النوعية في مسودة المواصفات القياسية ذات الرقم 1/693 (1988) العدد المسموح به لبكتريا القولون بان لا يزيد عن 100 CFU/g في الجبن الطري . واقر الجهاز في المسودة ذات الرقم 2/693 (1990) بخلو الجبن المطبوخ من بكتريا القولون (7) . كما وتقدّر قاعدة البيانات العالمية لمكتب الإحصاء السكاني (8) نسبة الحدوث السنوية الافتراضية ببكتريا القولون والأيشريكيا القولونية للشرق الأوسط في العراق بـ 6.810 باعتبار عدد السكان 25.374.691 . من خلال تجارب الباحثين المشتغلين في صناعة الجبن ونتيجة للبحث عن طريقة لحفظ الجبن الجاف وشبه الجاف لوحظ انفصال مكونات الجبن (ماء و دهن والبروتين) عن بعضها البعض أثناء طبخها مما أدى إلى البحث عن مركبات كيماوية لها القدرة على منع الانفصال إضافة إلى قابليتها على انتشار البروتين في المستحلب . تعمل أملاح الاستحلاب على إيقاف فاعلية الكالسيوم الذي يؤثر في ثبات هلام الجبن و أول خاصية لملح الاستحلاب قدرته على إذابة الكازين من خلال إنتاج سائل متجانس(9) . ولأملاح الاستحلاب القدرة في التأثير على خواص حفظ المنتج من الناحية البكتريولوجية من خلال تأثيرها القاتل Cidal أو المثبط Static لنمو الجراثيم (10). ولغرض معرفة الحجم الحقيقي لهذه المشكلة محليا , أجريت هذه الدراسة بأتباع تقنيات عزل وتشخيص بكتريا القولون وجراثيم الأيشريكيا القولونية لعينات من منتجات الجبن المحلي في النواحي التابعة لقضاء بعقوبة في محافظة ديالى على مدى الموسم الصيفي والشتوي. ان اهداف هذه الدراسة هو معرفة درجة التلوث لعينات الجبن الطري المنتج محليا ببكتريا القولون ولتحديد تاثير نوعية املاح الاستحلاب على بكتريا القولون.

المواد وطرائق العمل

تم العد الجرثومي الكلي لبكتريا القولون Total Coliforms Count (TCC) بطريقة العد القياسي بالأطباق Standard Plate Count (SPC)، أخذ 11 غم من عينة الجبن المراد فحصها ووضعت في الخلاط (Stomacher) وأضيف لها 99 مل من 2 % محلول سترات الصوديوم درجة حرارته 45 م ومزجت على السرعة العالية لمدة 5 دقائق للحصول على العينة كسائل مستحلب .

أجريت على العينة سلسلة من التخافيف العشرية. واستعمل طبقين للتخفيف الواحد ونقل 1مل و0.1 مل من المخفف إلى كل طبق وحضر وسط Violet Red Bile

Agar (VRBA) ووضع في أطباق تخافيف العينة. وزرع 1مل من المخفف وحضن عند درجة حرارة 32 م لمدة 24 ساعة لغرض حساب أعداد بكتريا القولون . واستخدم وسط Eosin Methylen Blue Agar (EMBA) ووضع في أطباق تخافيف العينة . وزرع 1مل من المخفف وحضن عند درجة حرارة 45 م لمدة 24 ساعة لغرض حساب أعداد الايشريكيا القولونية . يكون نمو بكتريا القولون على شكل مستعمرات ذات لون أحمر غامق أما مستعمرات الايشريكيا القولونية فذات لون اخضر معدني براق . تم انتقاء الطبق ألزرعي ذو التخفيف العشري الأمثل والذي تتراوح أعداد المستعمرات النامية فيه والمشخصة مظهريا ما بين 15-150 مستعمرة وحسب أعداد المستعمرات الكلية وأخذ المعدل لها ثم ضرب في مقلوب التخفيف للحصول على عدد مستعمرات بكتريا القولون/غم من عينة الجبن (CFU/g) (11-13) .

تأثير أملاح الاستحلاب في الايشريكيا القولونية: بعد التأكد وتثبيت هوية الجراثيم (14) أخذت عروة ناقلة قياسية واحدة من المستعمرات النقية المزروعة في المرق المغذي وحضنت بدرجة حرارة 23±1 م لمدة 24±2 ساعة . بعدها تم اخذ 1مل من المرق المغذي المزروع وأجريت التخافيف العشرية المطلوبة مع محلول الملح الفسلجي أو محلول دارئ الفوسفات وحسب العد في كل 1 مل من المرق , بعدها تم إضافة (2 و 2.5 و 3) غم من مسحوق أملاح الاستحلاب لكل 100مل من المرق المزروع ثم حسب أعداد مستعمرات الجراثيم النامية بعد إضافة أملاح الاستحلاب . تتضمن أملاح الاستحلاب المستخدمة في صناعة الجبن أملاح سترات ثلاثي الصوديوم trisodium citrate وأملاح أحادي فوسفات الصوديوم sodium monophosphate والبايروفوسفات الصوديوم sodium pyrophosphat وثلاثي فوسفات خماسي الصوديوم penta sodium tripolyphosphate وملح كراهام . سداسي ميتافوسفات hexametaphosphate وثلاثي ميتافوسفات الصوديوم sodium trimetaphosphate ورباعي ميتافوسفات الصوديوم sodium tetraphosphate . وتم تحليل بيانات النتائج إحصائيا بتطبيق طريقة ANOVA باستخدام برنامج SAS . ويبين جدول (1) النسب المئوية لمكونات 4 خلطات من أملاح الاستحلاب المستخدمة في التجربة ونتائج التغير في الأس الهيدروجيني .

جدول, 1: النسب المئوية لمكونات 4 خلطات من أملاح الاستحلاب التجربة ونتائج التغير في الأس الهيدروجيني

مكونات خلطة ملح الاستحلاب %	خلطة (1)	خلطة (2)	خلطة (3)	خلطة (4)
Sodium tripolyphosphat	90	90	95	100
Trisodium citrate	5	10	-	-
Sodium carbonate	5	-	5	-
الأس الهيدروجيني pH	10.23	10.23	10	9

النتائج والمناقشة

لقد نصت توجيهات الاتحاد الأوربي (15) على أن لا يزيد العد الجرثومي الكلي Total Bacterial Count (TBC) عن 10^5 بكتريا/مل حليب أو منتجاته . واعدت المنظمات الصحية الدولية إصابة الإنسان ببكتريا القولون ذو أهمية صحية واقتصادية قصوى لكونها تسبب إصابة معوية حادة أو مضاعفات مرضية خطيرة أو كلاهما . وتحدث الإصابة عند تناول الطعام الملوث أما نتيجة وجود الجراثيم نفسها أو بسبب وجود الذيفانات التي تنتجها وتظهر الإصابة خلال ساعات وقد تصل إلى أيام . ومن خلال الدراسات والتقارير الصادرة عن هيئة الأدوية والأغذية (16) ومراكز السيطرة على الأمراض (17) تبين أن نسبة حدوث الإصابة السنوية ببكتريا القولون قد تكون عالية وهي (1.06 حالة / 100000) إلا أن خطورة الإصابة ونسبة الوفاة تكون قليلة وهي (0.94 نسبة وفاة / 100 حالة مصابة) مقارنة بجراثيم أخرى تكون نسبة حدوث الإصابة قليل إلا أن نسبة الوفاة عالية .لقد أثبتت نتائج التحليل المايكروبايولوجي أن عينات منتجات الجبن المصنع محليا والتي جمعت بصورة عشوائية من أسواق خمسة أطراف شعبية لنواحي تابعة لقضاء بعقوبة في محافظة ديالى وبمعدل 30 عينة لكل من الموسم الصيفي من بداية تموز إلى نهاية آب (2011) والموسم الشتوي من بداية كانون الأول (2011) إلى نهاية كانون الثاني (2012) أن جميع هذه العينات كانت ذات مستوى متدن من الناحية الصحية والنوعية وغير مطابقة للمواصفات المحلية والدولية. اذ تبين نتائج جدول (2) عدد العينات الموجبة إلى عدد العينات الكلي ونسب العزل ومعدلات العد الكلي لبكتريا القولون في الجبن المحلي للموسمين الصيفي (شهر 7و8) والشتوي (شهر 12و1).

جدول, 2: العزل الجرثومي لبكتريا القولون / غم من نماذج الجبن المحلي خلال فترة التجربة

الشهر	عدد العينات الموجبة عدد العينات الكلي/	نسبة العزل %	معدل العد الجرثومي CFU/g
تموز	9/15	60	$10^6\times$ 2.7
آب	8/15	53.3	$10^6\times$ 3.2
كانون الأول	7/15	46.6	$10^5\times$ 7.5
كانون الثاني	6/15	40	$10^5\times$ 6.8
الكلي	30/60	50	$10^5\times$5.1

بينما تبين نتائج جدول (3) عدد العينات الموجبة إلى عدد العينات الكلي ونسب العزل ومعدلات العد الكلي لبكتريا القولون في الجبن المحلي في المناطق الشعبية التي تم جمع العينات منها للموسمين الصيفي والشتوي وفي كلا الجدولين (2و3) نجد أن نسب المعدل الكلي لمعدلات تواجد بكتريا القولون CFU/g في هذه المنتجات كان 50% .

جدول 3: نسب العزل ومعدل العد الجرثومي لبكتريا القولون / غم في محلات المناطق الشعبية

المنطقة الشعبية	عدد العينات الموجبة للموسم الصيفي عدد العينات الكلي/	عدد العينات الموجبة للموسم الشتوي عدد العينات الكلي/	عدد العينات الموجبة عدد العينات الكلي/	نسبة العزل %	معدل العد الجرثومي CFU/g
1	**4/6**	**3/6**	**7 / 12**	**34**	$10^6\times$ 1.4
2	**4/6**	**3/6**	**7 / 12**	**34**	$10^5\times$ 1.8
3	**2/6**	**2/6**	**4 / 12**	**32**	$10^6\times$ 3.7
4	**4/6**	**2/6**	**6 / 12**	**50**	$10^5\times$ 4.2
5	**3/6**	**3/6**	**6 / 12**	**50**	$10^6\times$ 4.2
الكلي	**17/30**	**13/30**	**30 /60**	**50**	**$10^5\times$ 5.1**

بينما تؤكد نتائج جدول (4) إن لفصول السنة تأثير في العد الجرثومي الكلي TBC للجبن الطري ولكل من بكتريا القولون وجراثيم الايشريكيا القولونية حيث أظهرت نتائج الفحص الإحصائي وجود فرق عالي المعنوية ($P<0.01$) في معدلات العد الجرثومي الكلي CFU/g للموسم الصيفي عن الموسم الشتوي . ويعزى هذا العد المرتفع إلى أسباب كثيرة منها ملائمة درجة حرارة الجو لنمو وتكاثر هذة الجراثيم وازدياد حالات الإصابة بالتهاب الضرع وحصول زيادة بطرح الجراثيم مع فضلات الأبقار خلال موسم الصيف (3 و4) وسوء تطبيق القوانين الصحية عند الإنتاج والتسويق والعرض إضافة إلى التكاثر السريع للجراثيم في منتجات الجبن المحلي عندما تصبح درجة حرارته قريبة من الدرجة المثلى لنموها خلال الموسم الصيفي حيث تتعرض لظروف التبريد والإذابة المتكررة بسبب انقطاع التيار الكهربائي أثناء الخزن فضلا عن بقاءها لفترات طويلة في محلات البيع وعدم استهلاكها بوقت قصير من قبل المواطن مما يعرضها لهذه الظروف ولأطول الفترات .

كما ويلاحظ أيضا وجود فرق عالي المعنوية عند مستوى ($P<0.01$) في معدلات العد الكلي لبكتريا القولون CFU/g للموسم الصيفي عن الموسم الشتوي في حين لم يكن هناك فرق معنوي في المعدلات المرتفعة في العد للايشريكيا القولونية CFU/g خلال الموسمين . ويعزى هذا الاستمرار في العد المرتفع إلى أسباب كثيرة منها تأثر الأبقار بالإصابة السريرية وتحت السريرية بالتهاب الضرع المتسبب عن الايشريكيا القولونية والاستمرار بطرح جراثيم الأيشريكيا القولونية مع فضلات الأبقار كونها تعد المستودع الرئيسي لهذه الجراثيم (3و4).

جدول 4: مقارنة معدلات العد الجرثومي لعينات الجبن الطري المحلي لكل من الموسم الصيفي والشتوي

CFU	الموسم الصيفي العد الجرثومي الكلي ± الخطأ القياسي SE	الموسم الشتوي العد الجرثومي الكلي ± الخطأ القياسي SE	مستوى المعنوية ** اختلاف عالي المعنوية ($P<0.01$)
العد الجرثومي الكلي TBC	**$\pm10^7\times12.083$ -$10^7\times1.80$ $10^7\times0.086$**	**$\pm10^7\times9.5$ -$10^7\times1.20$ $10^7\times0.087$**	**
عد بكتريا القولون	**$10^5\times3.2$**	**$10^5\times3.0$**	**
عد الايشريكيا القولونية/ غم	**$10^4\times8.2$**	**$10^4\times7.5$**	**غير معنوي**

تشير نتائج جدول (5) بوجود فرق عالي المعنوية ($P<0.01$) في معدلات العد الكلي لبكتريا القولون CFU/g قبل وبعد إضافة (2 و2.5 و3 %) من أملاح الاستحلاب إلى المرق المغذي ويعزى هذا الاختلاف نتيجة تغير الأس الهيدروجيني للمرق المغذي ليصبح قاعدي بفعل أملاح الاستحلاب المضافة وغير صالح لنمو هذة الجراثيم . حيث كان الأس الهيدروجيني للمرق المغذي 7.2 وأصبح بعد إضافة الأملاح (9.8 و9.85 و9.9) على التوالي . مما أدى إلى انعدام نمو جراثيم بكتريا القولون في عينات المرق المغذي .

جدول 5: معدلات العد لبكتريا القولون /غم في عينات المرق المغذي المتأثرة بإضافة أملاح الاستحلاب%

نسبة ملح الاستحلاب المضاف للـNA	% 0	% 2	% 2.5	% 3	مستوى المعنوية ** اختلاف عالي المعنوية ($P<0.01$)
الأس الهيدروجيني pH	**7.2**	**9.8**	**9.85**	**9.9**	-
عد بكتريا القولون /غم	**B $10^6\times1.14$**	**A 0**	**A 0**	**A 0**	**

تؤكد نتائج جدول (6) إن لبعض أملاح الاستحلاب تأثير قاتل Cidal أو مثبط Static للجراثيم (11) فعند إضافة تركيز 2.5 % من أملاح استحلاب من خلطة (2) المستخدمة في التجربة كان هناك انخفاض عالي المعنوية ($P<0.01$) في العد الجرثومي الكلي من $10^6\times1.2$ إلى $10^4\times6.7$ CFU/g وفي عد الايشريكيا القولونية من $10^6\times1.0$ إلى $10^3\times8.2$ CFU/g ويعزى هذا الاختلاف نتيجة التأثير المثبط للبكتريا Bacteriostatic بفعل أملاح الاستحلاب. وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه كل من (18و19).

جدول 6: تأثير إضافة خلطة (2) بنسبة 2.5% على العد الجرثومي الكلي وعد الايشريكيا القولونية /غم للجبن

ملح الاستحلاب %	% 0	% 2.5	مستوى المعنوية ** اختلاف عالي المعنوية (P<0.01)
العد الجرثومي الكليTBC	10^{6}×1.2	10^{4}×6.7	**
عد الايشريكيا القولونية / غم	10^{6}×1.0	10^{3}×8.2	**

المصادر

1. Andrews, A.H. and Humphreys, D.J. (1992). Poisoning in Vet. Practice, Nat. O. of Animal Health, Enfield, PP:1-114.
2. Boor, K.J.; Brown, D.P.; Murphy, S.C.; Kozlowski, S.M. and Bandler, D.K. (1998). Microbial and chemical quality of raw milk. J. Dairy Sci., 81:1743-1748.
3. Andrews, A.H.; Blowey, R.W.; Boyd, H. and Eddy, R.G. (2004). Bovine Medicine, Text Book of Diseases and Husbandry of Cattle. 2nd Ed. Oxford.UK. Part 2 Chapter 14 PP: 201-204.
4. Cynthia, M. K. (2010). The Merck Veterinary Manual. 10th Ed. Washington. USA. Zoonosis. Digestive System section, (*E.coli spp*.) P: 2758.
5. Shebib, Z.A.; Abdul-Ghani, Z.G. and Mahdi, L.Kh. (2003). First report of *Escherichia coli* among Iraqi children. Eastern Mediterranean Health J., 0(1-2):159-166.
6. Wang, G.; Zhao, T. and Doyle, M.P.(1997). Survival and growth of *E. coli* in unpasteurized and pasteurized milk. Food Protection J., 60 (6):610-613.
7. Iraq std. B.(1988;1990). Iraqi Central Board for Standardization.
8. US Census Bureau, International Data Base, (2004).
9. Meyer, A. (1973). Processed Cheese Manufacture .Food Trade Press , LTD . London.
10. Ruf, F. and Kehrer, H. (1964). Processed cheese manufactuer. Food press .Ltd. London. Cited by Meyer, A. (1973). Processed Cheese Manufacture .Food Trade Press, LTD. London.
11. Noveir, M.R. and Halkman, A.K. (2000). A study on selective broths and agar media for the isolation of *E. coli* serotype. Turk .J. Vet. Anim. Sci., 24:459-464.
12. Scoter, S.; Aldridg., M. and Capps, K.(2000). Validation of a method for the detection of *E. coli* in foods. Food Control, 11:85-95.
13. Murphy,S.C.(1997). Raw milk bacteria tests : Standard Plate Count , Coliform Count , PP:34-42.
14. Bergey, D.H. (1923). Berge's Manual of Determinative Bacteriology . Vol. I. Family Entero bacteriaceae. Genus E.coli. Wikipedia, the Free Encyclopedia .USA.
15. EC: European Community Directive 92/46.
16. FDA (2002). Food and Drug Administration, *Escherichia coli*. Center for food safety and applied nutrition food borne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Vm.cfsan.fda.gov/ mow/ chap 15.html, accessed March 2002. Flora., PP:36-43.
17. CDC (2005). Centers for Disease Control and Prevention , Compendium of measures to prevent disease associated with animals in public setting. National Association of State Public Heath Veterinarian. Inc. (NASPHV). MMWR.54.
18. Al-Shdidi, A.M. (1989). Microbio-logical evaluation of locally produced soft cheese. MSc. thesis (in Arabic), College of Veterinary Medicine .University of Baghdad.
19. Al-Shdidi, A.M. (1998). The Healthful aspects of locally produced s soft cheese and the effect of processing on its quality PhD Thesis (in Arabic), College of Veterinary Medicine. University of Baghdad.

Enumeration of Coliform Bacteria in the locally produced cheese in Dyiala and the effect of Emulsifying salts on such bacteria

Ahmed M. Saleh; Shukr M. Yasin and Rafid S. Abdul-Karime
Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Diyala University, Iraq

Summary

This study was conducted to indicate the comparative measurements of microbial load of Fecal Coliform Bacteria and *Escherichia coli*. in 60 samples of locally produced soft cheese those were collected randomly from five different local areas in Diyala (30 samples for each summer and winter seasons) to investigate their microbial load. All summer and winter samples had significantly ($P<0.01$) higher microbial count of Coliform Bacteria and *Escherichia coli*. The Bacteriostatic & Bacteriocidal effect of emulsifying salts on microbial activity was confirmed when the Total Coliform Count (TCC) were high significance ($P<0.01$) reduce in processed cheese with 2.5% emulsifying salts added Where no growth of *Escherichia coli* in nutrient broth with 2% emulsifying salts added . Data revealed that the best mix of emulsifying salts was that which composed of 90% Sodium tripolyphosphate + 10% Trisodium citrate.

Keywords: Coliform Bacteria, Soft Cheese, Food Poisoning, Emulsifying salts.