عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* O157:H7 ودراسة اعدادها وأعداد بكتريا القولون الكلية والبرازية في لحوم البقر الطازجة المفرومة في محافظة البصرة

نوفل عبد الامير حسين صباح مالك حبيب الشطي *سحر صبيح جورج

قسم علوم الاغذية – كلية الزراعة – جامعة البصرة – العراق

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة للكشف عن تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7 وأعداد بكتريا القولون الكلية والايشيريشيا البرازية باستخدام طريقة حديثة ومتطورة petrifilm ^{3M} للحم البقر الطازج المفروم ولخمس مناطق مختلفة من محافظة البصرة وهي (الجزائر، ابي الخصيب، الزبير، البصرة القديمة وكرمة علي خلال المدة الممتدة من شهر كانون الثاني 2013 لغاية شهر كانون الاول 2013 وقد تم الحصول على 27 عزلة موجبة لبكتريا *E.coli* O157:H7 من اصل 540 عينة لحم بقري طازج مفروم وبنسبة 5% من مجموع العينات طول مدة البحث, وقد اعتمد في التشخيص الفحوصات المظهرية والاختبارات الكيموحيوية على وسط Sorbitol MacConkey Agar وبأستخدام نظام API20E وكت التشخيص اللاتكس اذ بينت النتائج بأن لحم البقر الطازج المفروم لمنطقة ابي الخصيب كان الاقل تلوثاً ببكتريا القولون الكلية اذ بلغ متوسط لوغاريتم اعداد بكتريا القولون الكلية 1.52 cfu/g خلال شهر شباط بينما بلغ ادنى متوسط للوغاريتم أعداد بكتريا *E.coli* 1.53 cfu/g لشهر ايار كما لوحظ وجود ارتفاعاً كبيراً بمعدلات متوسطات لوغاريتم اعداد بكتريا القولون الكلية و*E.coli* للحوم الطازجة المفرومة لمنطقة البصرة القديمة اذ كانت الاكثر تلوثاً عند مقارنتها مع بقية المناطق الاخرى المشمولة بالدراسة

Key word :Isolation, identification ,*E.coli*o157:h7, coliform ,fresh meat .

المقـدمة

تعد اللحوم وجبة غذائية مهمة للإنسان وذلك لكونها غنيا بالبروتين الحيواني والدهون والمعادن والفيتامينات كما إنها تزيد من قدرة الغدد اللعابية والمعدة على إفراز أنزيماتها بالإضافة إلى بقائها في المعدة لفترة طويلة لذا يشعر الإنسان بالشبع وبالرغم من الإقبال المتزايد على تناول واستهلاك اللحوم الأ إنها قد تكون مصدر خطر على صحة الإنسان لكونه بيئة غنية بالعناصر الغذائية الضرورية لنمو أنواع مختلفة من البكتريا المرضية وغير المرضية إذ تنتقل عن طريق اللحم إلى الإنسان وتسبب مشاكل صحية (الاتاسي، 1998 و Barnett, 2003)، وتعتبر الابقار من المخازن الرئيسية لبكتريا القولون باجناسها

*مستل من أطروحة دكتوراه للباحث الثالث

المختلفة التي تلوث اللحوم ومنتجاتها فبكتريا *Escherichia Coli* هي بكتريا معوية (Bell, 2002)، فهي تتوطن بصورة طبيعية في أمعاء الإنسان والحيوانات الثديية الأخرى ومنها الأبقار (Wilshaw *et al.*, 2000), و إن الأغذية ذات المنشأ البقري كاللحوم المفرومة ومنتجاتها من أهم مسببات العدوى ببكتريا *E.coli* المصلية المحتوية على المستضد O و H ومنها *E.coli* O157:H7 (Doyle *et al.*, 1997), وان بكتريا *E.coli* O157:H7 تدخل ضمن تصنيف البكتريا المرضية الخطرة المؤثرة على صحة الإنسان العامة إذ من الممكن ان تسبب حالات الإسهال و التسمم الغذائي وقد تحدث حالات الوفاة وتحدث بصورة اكبر في الدول الفقيرة والبلدان النامية التي تفتقر إلى النظافة (Nigatu and Gashe, 1994).

تشمل عائلة Enterobacteriaceae مجموعة متنوعة من اجناس البكتريا وهي *Escherichia* و *Proteus* و *Salmonella* و *Shigella* و *Klebsiella* و*Serratia* و*Erwinia* و*Yersinia* و*Enterobacter* (Humphery *et al.*, 1991), تتميز هذه الأجناس من البكتريا بكونها عصيات معوية سالبة لصبغة كرام بعضها متحركة باسواط وأخرى غير متحركة, موجبة للكاتاليز وسالبة للاوكسيديز, هوائية اختيارية وبعضها لاهوائية اختيارية تنمو بدرجة حرارة 37 مْ والبعض الآخر ينمو عند درجة حرارة 44.5 مْ (Hensyl, 1994). كما تعد بكتريا القولون الكلية (Total Coliform) جزء من هذه العائلة وتسمى بكتريا القولون المعوية (SkrÖkki, 1997) اما بالنسبة لبكتريا *E.coli* التي تعرف باسم الاشيريشية هي نوع من البكتريا التي تتواجد بالقناة الهضمية للإنسان والحيوانات ذوات الدم الحار ووجودها يعد مؤشراً للكشف عن مدى التلوث البرازي لتقييم سلامة الأغذية والمياه الصالحة للشرب (Brandl, 2006) .

تعود بكتريا *E.coli* O157:H7 إلى النمط المصلي الذي ترجع تسميته إلى (O ومستضد 157 وH سوطي مستضد 7) من بكتريا *E.coli* (Griffin *et al* ., 1995) اذ تنتمي إلى مجموعة Enterohemorrhagic (EHEC) ويتم تصنيف سلالات *E.coli* O157 إلى *E.coli* O157:H7 الموجبة المتحركة التي تحتوي على مستضد حركي سوطي (H) و *E.coli* O157.nw غير المتحركة الفاقدة للمستضد (H) السوطي.

ونظراً لندرة الدراسات حول مستوى تلوث اللحوم بصورة عامة وخاصة لحم البقر المفروم ببكتريا القولون الكلية و*E.coli* و *E.coli* O157:H7 الخطرة والتي لها علاقة بصحة المستهلك في محافظة البصرة وبسبب قلة الدراسات الخاصة للكشف عن تواجد مثل هذه البكتريا في اللحوم المفرومة لذا جاءت هذه الدراسة والتي تهدف إلى:

الكشف عن تلوث اللحوم ببكتريا *E.coli* O157.H7 من خلال اجراء مسح شهري دوري لمدة سنة ثم عزلها وتشخيصها و دراسة أعداد بكتريا القولون الكلية و *E.coli* في عينات اللحم المفروم في مناطق مختلفة شهرياً لمدة سنة باستخدام أحدث الطرق المتمثلة بأغشية 3M™ Petrifilim™ .

المواد وطرائق العمل

جمع العينات

جمعت 540 عينة من اللحم البقري الطازج المفروم ابتداءاً من شهر كانون الثاني – كانون الاول للعام 2013، إذ شملت 5 مناطق مختلفة من محافظة البصرة وهي الجزائر, البصرة القديمة, الزبير, كرمة علي و ابي الخصيب بمعدل 3 محلات جزارة عشوائية وبواقع 250 غرام من اللحم المفروم لكل منطقة إذ نقلت العيناة بعد وضعها بأكياس نظيفة ومعقمة من البولي اثلين بطريقة مبردة بأستخدام صندوق الثلج الى مختبر الانزيمات التابع لقسم علوم الاغذية / كلية الزراعة / جامعة البصرة للكشف عن تواجد كلاً من بكتريا القولون coliform والايشيريشيا القولونية *E.coli* والايشيريشيا القولونية المصلية *E.coli* O157:H7 .

تحضير العينات للزرع

بعد جمع عينات اللحم المفروم من أسواق محافظة البصرة وزن 25 غم من كل عينة داخل كيس بلاستيكي معقم واضيف لها الوسط الغذائي(MTSB) modified trypticase soya broth بمعدل 225 مليلتر ومزج الخليط بأستخدام (Stomacher) لمدة 2–3 دقائق لتتجانس العينات.إذ حضنت بحاضنة هزازة بدرجة 37 مْ وبسرعة 200 دورة / دقيقة لمدة 6 ساعات.

العزل البكتيري

حضرت تخافيف مختلفة للزرع وأوساط زرعيه بالاضافة الى استخدام التقنية الحديثة 3M™ Petrifilm™ المستخدمة في عد بكتريا القولون الكلية *E.coli* O157:H7 وفق تعليمات الشركة المجهزة (Oxoid / England) للتأكد من وجود بكتريا الايشيريشيا القولونية والنمط المصلي *E.coli* O157:H7 في نمإذج اللحوم المفرومة، تم نقل 1 مليلتر من التخافيف اللازمة بأستخدام المايكروبايبيت وزرعت على pitrifilm وحضنت بالحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة حيث تعد المستعمرات الزرقاء النامية وهي *E.coli* وتكون منتجة للغاز ومكونة فقاعات غازية بينما بكتريا القولون الكلية تكون باللون الاحمر وحسب تعليمات الشركة المجهزة (3M) كما تم نشر 0.1 مليلتر من التخافيف المحضرة من الوسط الزرعي السائل الخاص ب (MTSB) *E.coli* O157:H7 و تزرع بالوسط الصلب (cefixim tellurite sorbitol MacConky Agar) المحضر حسب تعليمات شركة Oxoid إذ حضنت الاطباق بصورة مقلوبة بالحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 ساعة (Noveir, 2000) .تم الكشف عن وجود بكتريا *E.coli* O157:H7 بواسطة الوسط الزرعي SMAC فالمستعمـرات عديمـة اللون المائلـة الى البني الشفافة والمتميزة بعدم قدرتها على تخمير سكر السوربيتول المظهرة للتحبب السريع بواسطة كت اللاتكس تكون بكتريا النمط المصلي *E.coli* O157:H7 .(Paton *et al.*, 1998)

شكل (1) المدعم الحيوي Cefixime Tellurite

شكل (2) كت التشخيص(اللاتكس)

الاختبارات التشخيصية لبكتريا *E.coli*

الاختبارات المظهرية

تم تشخيص المستعمرات النامية والمعزولة على الاوساط الانتقائية (SMAC) اعتماداً على صفاتـــها المظهريـــة والتي تشمـــل شكـــل المستعمـــرة ولونهـــا وحجمهـــا وحافتهـــا(Scoters *et al.*, 2000).

الاختبارات الكيموحيوية

شخصت البكتريا كونها *E.coli* بعد تصبيغها بصبغة كرام واجراء فحوصات IMViC وكذلك استخدام نظام $API_{20}E$, وبعد اجراء اختبار $API_{20}E$ والتأكد من عدم تخمير العزلات البكتيرية للسوربيتول يتم اجراء أربع أختبارات كيموحيوية لتعطينا التفاعلات التالية

1- اختبار تخمير السيليلوبايوز (-)

2- اختبار النمو بسيانيد البوتاسيوم KCN (-)

3- اختبار أنتاج إنزيم B-Glocuronidase (MUG) (-)

4- اختبار أنتاج Enterohemolysin (+)

وبهذه الطريقة يمكن اعتبار العزلة من نمط *E.coli* O157:H7 (Cheesbrough, 2003)، يمكن الجزم بكون العزلة من نمط *E.coli* O157:H7 وذلك باستخدام كت التشخيص Latex التابع لشركة Oxoid المحتوي على أربع كواشف وهي كالتالي

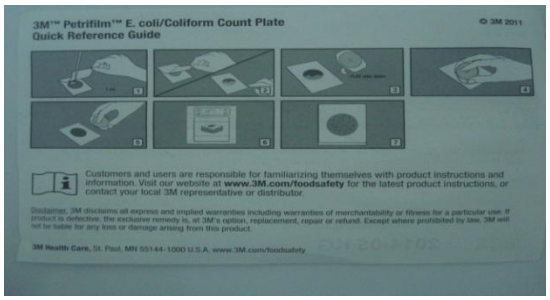
o157 test latex , control positive , control negative و o157control latex

تم تكوين عالق بكتيري ونقلت مستعمرة مفردة بواسطة اللوب المعقم بعد وضع قطرة من الماء المقطر المعقم على شريحة الكت ثم تمزج جيدا مع قطرة الكاشف O157 test latex ففي حالة ظهور تلازن سريع في اقل من دقيقة واحدة فذلك دليل على النتيجة الموجبة وهذا يؤكد بأن العزلة البكتيرية مصلية (Hitchins *et al.*, 1998).

طريقة petrifilm العشوا ئية لعد بكتريا *E.coli* ,Coliform

وهي تقنية حديثة وسهلة تستخدم لعد البكتريا ويتكون من شريحة مسطحة تحتوي على دائرة مقسمة الى 20 مربع صغير إذ ينقل بواسطة المايكروبايبيت 1 مليلتر من التخفيف المعد للزرع ويوضع في وسط شريحة petrifilm برفق لمنع حدوث فقاعات هوائية او تخدشه ثم تنشر الزرعة البكتيرية بواسطة قطعة مقعرة بلاستيكية مرفقة مع الكت وتوضع فوقه ويتم الضغط في منتصف التقعر وتترك لفترة لضمان الانتشار المتساوي للتخفيف ثم توضع بالحاضنة بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24 – 48 ساعة بعدها يتم عد المستعمرات النامية الملونة (Blackburn and Mccarthy, 2000).

شكل (3) حافظة Petrifilm لبكتريا القولون



شكل (4) خطوات الزرع في Petrifilm

اختبار فوكس بروسكاوير Voges –proskauer

يضاف قطرة واحدة من كاشف VP1 وقطرة من كاشف VP2 ويترك لمدة 10 دقائق في حالة ظهور لون وردي فاتح او احمر فأن نتيجة الاختبار تعد موجبة (Benson, 2001).

اختبار الأندول Indol test

نضيف قطرة من كاشف james ويتم التفاعل بصورة مباشرة فعند ظهور اللون الوردي في قمة الانبوبة فذلك دليل على النتيجة الموجبة وعند اضافة كاشف IND والانتظار لمدة دقيقتين ففي حالة ظهور حلقة حمراء في سطح الانبوبة فذلك دليل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

اختبار TDA

نضع قطرة واحدة من كاشف TDA فعند ظهور اللون البني الداكن دليل على النتيجة الموجبة (Macfaddin, 2000).

اختبار الكشف عن النتريت NO_2 test

نضيف قطرة من كاشف NIT1 وقطرة من كاشف NIT2 الى انبوبة GLU (انبوبة الكلوكوز) وننتظر لمدة 2–3 دقائق اذا ظهر لون احمر واصفر يعني ان النتيجة موجبة في حين ان اللون الوردي يعني بأن النتيجة سالبة (Benson, 2001).

التحليل الاحصائي

حللت البيانات إحصائيا باستخدام البرنامج الإحصائي spss وأستخدم التصميم العشوائي الكامل C.R.D واختبرت العوامل المدروسة باستعمال أقل فرق معنوي المعدل R.L.S.D وعند مستوى احتمال 0.05 و 0.01 حسب (الراوي وخلف الله . 2000 ؛ Spss . 2009).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* O157.H7

الكشف عن تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7

أجري الكشف عن تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7 في اللحم البقري المفروم في محافظة البصرة باختيار خمس مناطق وهي (الجزائر، أبي الخصيب، الزبير، البصرة القديمة وكرمة علي) خلال فصول السنة الأربعة بصورة دورية ولكل شهر من اشهر السنة ومن ثم عزل البكتريا وكما موضح في جدول (1)

جدول (1) الكشف عن تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7 في نماذج لحم البقر المفروم لمناطق الدراسة مختلفة وخلال اشهر السنة

الأشهر	المناطق				
	الجزائر	أبي الخصيب	الزبير	البصرة القديمة	كرمة علي
كانون الثاني	-	-	-	-	-
شباط	-	-	-	+	+
آذار	-	-	-	+	-
نيسان	-	-	+	+	-
أيار	-	-	-	-	-
حزيران	-	-	-	-	-
تموز	-	-	-	-	+
آب	-	-	-	-	-
أيلول	-	-	-	-	-
تشرين الأول	-	-	-	+	-
تشرين الثاني	+	-	+	-	-
كانون الأول	-	-	-	-	-

(-) عدم ظهور أي تواجد لبكتريا *E.coli* O157:H7، (+) تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7

يلاحظ من الجدول (1) تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7 بنسب متفاوتة تبعاً للاختلاف في المناطق ومدى التلوث بمحلات الجزارة التابعة لكل منها فقد كان أعلى مستوى تلوث للحم البقر المفروم بمنطقة البصرة القديمة تليها منطقتي الزبير وكرمة علي في حين وجد أن منطقة الجزائر ظهر فيها تلوث بسيط بينما لم يلاحظ أي تلوث للحم البقر المفروم في محلات جزارة منطقة أبي الخصيب قد أن يعزى ذلك إلى اختلاف مستويات النظافة في محلات الجزارة للمناطق المختلفة أثناء الذبح وتماس الذبيحة مع فضلاتها وجلدها وأحشاءها الداخلية الملوثة إذ تنتقل البكتريا من اللحم الملوث إلى أجهزة الفرم وبالتالي يتلوث اللحم بأكمله واتفقت النتائج مع دراسات سابقة (Shaw *et al.*, 1993) (Paton and Paton (1998) كما أن بقاء اللحوم في محلات البيع لفترات مختلفة و بصورة متفاوتة في المناطق المختلفة ممكن ان يعتبر سبباً أخر للتلوث وهذا يتفق مع ما ذكره محمد وعبد المحسن (2008).

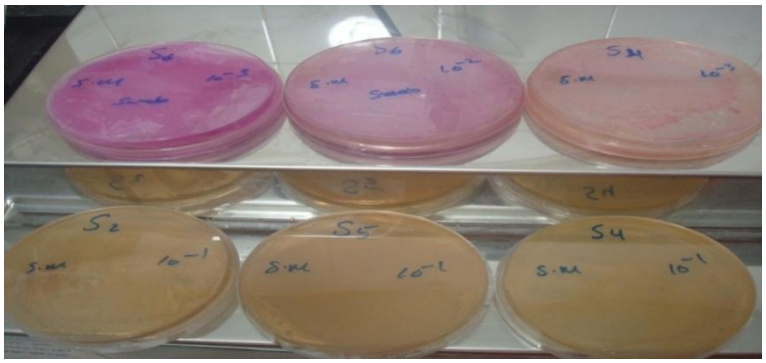
كما أظهرت النتائج أعلاه بأن اللحوم أعطت نتيجة موجبة بتلوث اللحوم ببكتريا *E.coli* o157:H7 خلال الأشهر شباط، آذار, نيسان، تموز، تشرين الأول وتشرين الثاني بينما كانت النتيجة سالبة لبقية أشهر السنة وقد يعود السبب إلى اعتدال درجات الحرارة في محافظة البصرة خلال الأشهر التي أظهرت النتيجة الموجبة وهي ظروف ملائمة لنمو وتواجد بكتريا *E.coli* O157:H7 بينما انعدم تواجد هذه البكتريا في فصل الصيف الحار والشتاء الذي انخفضت فيه درجات الحرارة وهي أجواء غير ملائمة لنمو بكتريا *E.coli* O157:H7 وهذا يتفق مع ما ذكره Duncan *et al.* (2000) و USDA/FSIS,(2001) إذ أشاروا إلى كثرة تواجد بكتريا *E.coli* O157:H7 خلال فصلي الصيف والربيع نتيجة ملائمة الحرارة لنمو هذه البكتريا في الولايات المتحدة الأمريكية ويكون تواجدها منخفض أو معدوم في الأشهر الباردة التي تنخفض فيها درجات الحرارة.

العزل والتشخيص

عزل وتشخيص بكتريا *E.coli* O157:H7

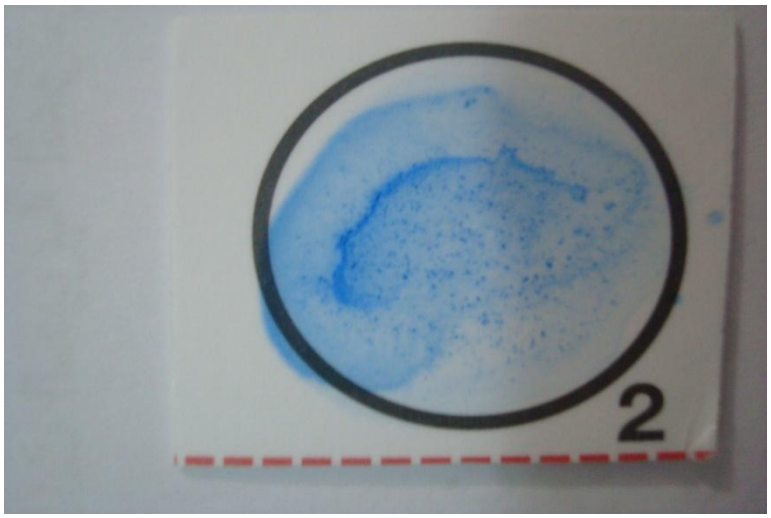
استخدمت طرق انتقائية لغرض عزل بكتريا *E.coli* O157:H7 من عينات اللحم البقري المفروم في خمس مناطق من محافظة البصرة، إذ تم الحصول على 27 عزلة موجبة لبكتريا *E.coli* O157:H7 من اصل 540 عينة لحم بقر مفروم وبنسبة 5% شهرياً طيلة البحث الدوري الذي استغرق سنة كاملة كما موضح في

جدول (1). أجريت مجموعة من الخطوات التابعة لفحوصات تمييز البكتريا التي يرجع أصلها إلى مجموعة *E.coli* غير المخمرة للسوربيتول وذلك بتنميتها على الوسط الانتقائي الخاص بهذه البكتريا Sorbitol MacConkey Agar المدعم بالسفكسيم تولريت لغرض إقصاء البكتريا المصلية من مجاميع الاشريشيا القولونية التي تخمر السوربيتول وأنواع بكتيرية أخرى وبحصيلة نهائية 27 عزلة من بكتريا *E.coli* O157:H7 ولهذه الأوساط الانتقائية خصائص كيموحيوية ظاهرة من اهمها عدم قدرة البكتريا على تخمير السوربيتول عند مقارنته بسلالات بكتيرية اخرى.



شكل (5) تواجد بكتريا *E.coli* O157.H7 في وسطها الانتقائي

وقد مرت دراسات أخرى استخدمت فيها هذه الفحوصات الكيموحيوية والأوساط الانتقائية الخاصة لغرض تشخيص بكتريا *E.coli* O157:H7 والتي ليس لها القابلية على تخمير السوربيتول بدراسات خاصة لعزل البكتريا المصلية من لحوم الأبقار (ظاهر وآخرون 2010 واحمد وآخرون 2011) وقد اعتمد في التشخيص النهائي للبكتريا استخدام نظام $API_{20}E$ في بداية الأمر لتأكيد عائدية العزلات لجنس بكتريا *E.coli* ثم ملاحظة ميزة أخرى هي عدم تخميرها للسوربيتول بعدها تم إجراء فحص التلازن باستخدام أشرطة اللاتكس والتي أظهرت تحبب واضح وهذا يدل على رجوع اصل البكتريا إلى جنسها المصلي *E.coli* O157.H7 (شكل، 6)



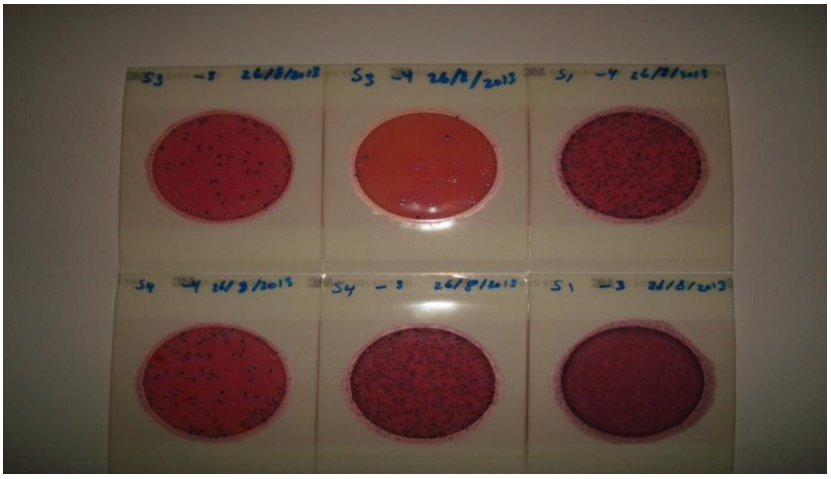
شكل (6) فحص التلازن الموجب لبكتريا *E.coli* O157:H7

وهذا يتفق مع ما بينه Farmer and Davis (1985) اللذان استخدما أشرطة اللاتكس لتأكيد جنس البكتريا *E.coli* O157:H7 بظهور التلازن.

وقد أظهرت النتائج بأن نسب عزل بكتريا *E.coli* O157:H7 من اللحوم البقرية المفرومة في محافظة البصرة بلغت 5% من مجموع العينات المأخوذة طيلة مدة البحث والذي استمر عام كامل وهذه النسبة كانت مقاربة لما توصل إليه Temelli *et al.* (2012) وبواقع 4 عينات من اصل 72 عينة لحم بقر وبنسبة مقدارها 5.55 % وأعطت نتيجة موجبة لاختبار التلازن باستخدام أشرطة اللاتكس, في حين أشارت دراسات أخرى إلى إن معدلات انتشار بكتريا *E.coli* O157:H7 في شرائح لحم البقر ارتفع في السنوات الأخيرة بنسبة تراوحت بين (1.1–36)% (Hussein, 2007)، وان تلوث اللحوم المفرومة ذات المنشأ البقري ببكتريا *E.coli* O157:H7 يعد مؤشراً لانتشار الأمراض الوبائية وهذا ما أشارت إليه دراسة Rangel *et al.* (2005) التي بينت بأن هذه البكتريا كانت سبباً رئيسياً لنشر الأمراض الوبائية في العالم وخاصة الولايات المتحدة الأمريكية التي سجلت حالات إصابة وبائية نتيجة لاستهلاك لحم ألبقر وقد بين الباحثين بوجود تفاوت في نسب تلوث اللحوم بين الدول المختلفة إذ بلغت نسبة التلوث 36% من اللحوم المفرومة في انكلترا (Shaw *et al.*, 1993), فيما كانت 6% بالنسبة للحم المفروم التركي (Cavi, 2006)، أما في مصر فقد وصلت النسبة إلى 9% إذ كانت نتيجة الحصول على عزلتين من اصل 22 نموذج من اللحم المفروم (El–Safey and Abdul–Raouf, 2003).

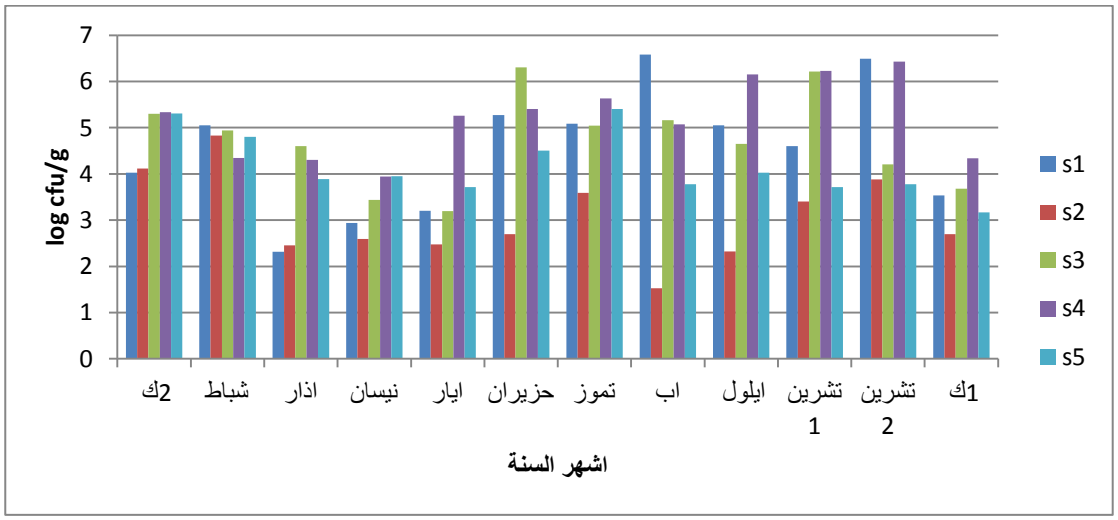
تأثير أشهر السنة والمناطق المختلفة **من محافظة البصرة** على متوسطات أعداد بكتريا القولون الكلية للحم الطازج المفروم

اتبعت في الدراسة الحالية طريقة حديثة ومتطورة لعد البكتريا وهي لوحات البتري فلم والتي تمتاز بدقتها العالية في إظهار النتائج واختصارها للوقت والمواد المستخدمة في الزرع مقارنة بطرق العد التقليدية، فالمستعمرات البكتيرية الحمراء والزرقاء النامية على شرائح البتري فلم بعض منها منتجة للفقاعات الغازية حول مستعمراتها وقد تخمر سكر اللاكتوز منتجة بذلك حامض (AOAC, 1995).



شكل (7) شرائح البتري فلم لعينات لحم البقر الطازج المفروم لمناطق مختلفة من محافظة البصرة

تشير النتائج في الشكل (8) إلى وجود فروق عالية المعنوية ($P<0.05$) لأعداد بكتريا القولون الكلية لعينات لحوم الأبقار الطازجة المفرومة لمناطق مختلفة من محافظة البصرة خلال اشهر السنة.



S1منطقة الجزائر، S2 منطقة أبي الخصيب، S3 منطقة الزبير، S4 منطقة البصرة القديمة، S5 منطقة كرمة علي

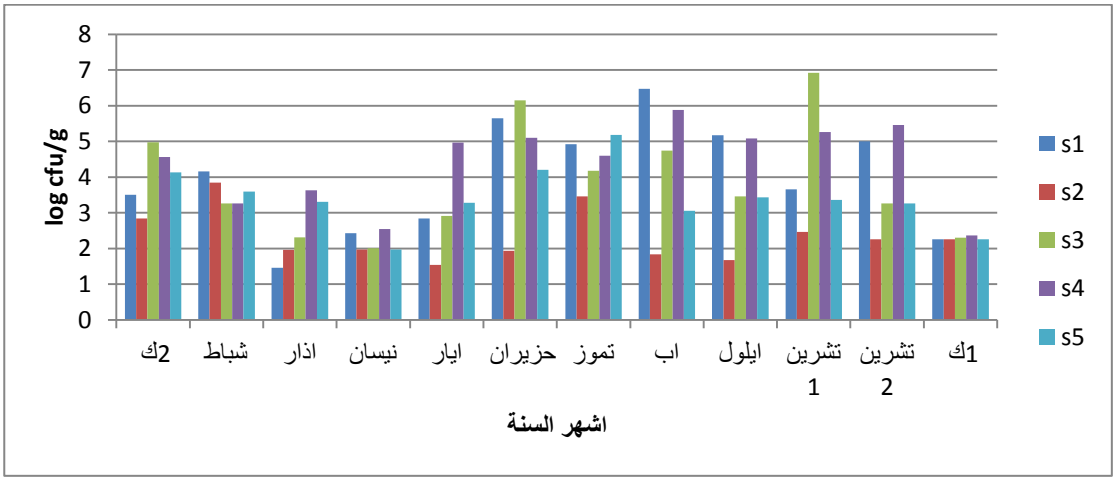
شكل (8) تأثير أشهر السنة والمناطق المختلفة على لوغارتم أعداد بكتريا القولون الكلية لعينات لحم البقر الطازج المفروم .

يظهر من الشكل (8) أعلى معدل لمتوسطات لوغارتم أعداد بكتريا القولون الكلية للحم البقر الطازج المفروم خلال شهر آب إذ بلغ 6.58 cfu/g بينما كان أدنى معدل لوغاريتمي لأعداد بكتريا القولون الكلية في شهر آذار وبلغ 2.32 cfu/g لمنطقة الجزائر، أما بالنسبة لعينات اللحم ألبقري الطازج المفروم لمنطقة أبي الخصيب فقد اظهر اقل نسبة تلوث في كل اشهر السنة بمقارنتها باللحوم الطازجة المفرومة لباقي مناطق مدينة البصرة وقد يرجع سبب ذلك إلى نظافة المنطقة وخلوها من مصادر التلوث الصناعية وأتباع الشروط الصحية أثناء الذبح واستهلاك الذبائح بصورة سريعة وعدم بقاء الذبائح لفترات طويلة في المحلات لتفضيلها على اللحوم المجمدة من قبل المستهلكين، إذ انخفضت متوسطات لوغارتم أعداد بكتريا القولون الكلية لتصل إلى 1.51 cfu/g خلال شهر شباط من السنة لمنطقة أبي الخصيب، في حين أظهرت النتائج بأن منطقة الزبير ارتفعت فيها متوسطات لوغارتم أعداد بكتريا القولون الكلية إذ بلغت حدودها القصوى خلال شهر حزيران وكانت 6.31 cfu/g، بينما أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى أن منطقة البصرة القديمة سجلت أعلى مستويات للتلوث خلال اشهر السنة المختلفة عند مقارنتها ببقية المناطق إذ بلغت أعداد بكتريا القولون الكلية (6.15، 6.23 و 6.43) cfu/g خلال الأشهر أيلول, تشرين الأول وتشرين الثاني على التوالي بينما كانت اقل من ذلك خلال اشهر السنة الأخرى وقد يعود سبب ارتفاع نسبة التلوث للمنطقة إلى عدم إتباع الشروط الصحية وقلة النظافة في محلات الجزارة والتداول غير الصحي للذبائح من قبل العاملين في محلات الجزارة مما يؤدي إلى تلوث سطح اللحوم ببكتريا القولون الكلية وبالتالي زيادة أعدادها عند مقارنتها بالمناطق الأخرى المشمولة بالدراسة (Siham and Taha, 2009)، كما أظهرت النتائج إلى ارتفاع متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون للحم ألبقر الطازج المفروم لمنطقة كرمة علي خلال شهري تموز وكانون الأول إذ بلغت 5.402 و 5.306 cfu/g على التوالي، كما أظهرت النتائج تباين في متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون الكلية خلال اشهر السنة المختلفة وقد يعزى سبب ذلك إلى تعرض اللحوم للتلوث أثناء الذبح والتداول اليدوي وعدم نظافة العاملين في محلات الجزارة وقلة إتباع الشروط الصحية وهذا يتفق مع ما ذكره الخزاعي (2011) والذي أشار إلى ارتفاع أعداد بكتريا القولون في لحوم الإبل الطازجة نتيجة عدم إتباع الشروط الصحية أثناء الذبح والتداول، أما بالنسبة لتأثير اشهر السنة على تلوث لحوم البقر الطازجة المفرومة فيلاحظ من النتائج عدم وجود فروق معنوية ما بين متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون الكلية عند مقارنة الأشهر كانون الأول مع شباط وحزيران وتشرين

الأول وكذلك الحال بالنسبة لمتوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون الكلية لشهر آب مع أيلول وآذار مع كانون الثاني, في حين وجد هناك فروق عالية المعنوية ($p<0.05$) عند مقارنة متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون الكلية لعينات لحوم البقر الطازجة المفرومة لباقي اشهر السنة مع بعضها ولجميع المناطق وقد يرجع سبب التفاوت في متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون الكلية إلى اختلاف درجات الحرارة خلال اشهر وفصول السنة وبالتالي قدرة البكتريا على التأقلم في الدرجات الحرارية المناسبة لها إذ لوحظ انخفاض واضح في متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون الكلية خلال فصل الشتاء بينما كان الانخفاض اقل في فصل الربيع وزيادة متباينة في فصلي الصيف والخريف وجاءت هذه النتائج متفقة مع ما بينه Arabi *et al* . (2014) والذي أشار إلى وجود فروق معنوية لمحتوى لحوم الإبل من البكتريا ومنها Coliform و*E.coli* خلال فصول السنة ووجود انخفاض في نمو بكتريا القولون الكلية و*E.coli* خلال فصل الشتاء.

تأثير أشهر السنة والمناطق المختلفة من محافظة البصرة على متوسطات لوغارتم أعداد بكتريا *E.coli* للحم الطازج المفروم

يظهر من الشكل (9) وجود فروق عالية المعنوية ($p<0.05$) لمتوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون البرازية للحوم البقر الطازجة المفرومة لمناطق مختلفة من محافظة البصرة خلال اشهر السنة.



S1 منطقة الجزائر، S2 منطقة أبي الخصيب، S3 منطقة الزبير، S4 منطقة البصرة القديمة ، S5 منطقة كرمة علي

شكل (9) تأثير أشهر السنة والمناطق المختلفة على لوغاريتم أعداد بكتريا *E.coli* لعينات لحم البقر الطازج المفروم

تشير نتائج الدراسة الحالية بأن أعلى متوسط للوغاريتم أعداد بكتريا القولون البرازية وجدت في منطقة الجزائر إذ بلغت 6.47 cfu/g في شهر آب في حين تبين النتائج بأن محلات الجزارة لقضاء أبي الخصيب قد سجلت اقل نسبة تلوث مقارنة بالمناطق الأخرى المشمولة بالدراسة إذ بلغت متوسطات لوغاريتم أعداد البكتريا (1.53، 1.67، 1.83، 1.92، 1.96 و1.97) cfu/g خلال الأشهر أيار، أيلول، آب، حزيران، آذار و نيسان على التوالي وقد يعود سبب هذا الانخفاض في متوسط لوغاريتم أعداد البكتريا إلى كون قضاء أبي الخصيب منطقة ريفية زراعية ويتم ذبح الحيوانات في محلات الجزارة وتباع مباشرة إلى المستهلك ولا يبقى لفترات خزن طويلة, بينما بينت النتائج إلى أن لحوم البقر الطازجة المفرومة لمنطقة البصرة القديمة كانت من أكثر اللحوم تلوثاً كونها منطقة شعبية تفتقر للنظافة والوسائل الصحية في عمليات الذبح والنقل والتداول وتلوث الذبيحة ببراز الحيوانات وهذا يعد سبباً رئيسياً لتلوث اللحوم ببكتريا القولون البرازية (Schwaiger *et al* ., 2012). أما بالنسبة لعينات اللحم لمنطقتي الزبير وكرمة علي فقد بلغ أعلى متوسط للوغاريتم أعداد بكتريا الايشريشيا البرازية لمنطقة الزبير (6.145 و 6.922) cfu/g لشهري حزيران وتشرين الأول على التوالي، أما منطقة كرمة علي فكانت متوسطات لوغارتم أعداد بكتريا القولون البرازية 5.175 cfu/g خلال شهر تموز.

وفيما يتعلق بتأثير اشهر السنة على متوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون البرازية للحم ألبقري الطازج المفروم فيلاحظ من الشكل (9) عدم وجود فروق معنوية ما بين اشهر نيسان مع كانون الأول وآب مع تموز وتشرين الأول وأيلول مع تشرين الثاني، بينما أشارت النتائج إلى وجود فروق عالية المعنوية ($p<0.05$) لمتوسطات لوغاريتم أعداد بكتريا القولون البرازية لبقية اشهر السنة مع بعضها وقد يعود السبب في زيادة أعداد البكتريا خلال الأشهر إلى ارتفاع درجات الحرارة واعتدالها لتوفر بيئة ملائمة لنمو البكتريا في حين تنخفض معدلاتها في المناخ البارد وتتفق النتائج الحالية مع ما ذكره عبد العالي وآخرون (2011) إذ بين بأن زيادة نمو وتواجد بكتريا *E.coli* في اللحوم المذبوحة بالمجازر تزداد في الأجواء الحارة وقلة إلى انعدام تواجدها في الأجواء الباردة.

المصادر

أحمد, شذى ذنون وامنة نصيف جاسم و اياد محمد علي فاضل (2011). عزل وتوصيف بكتريا *E.coli* O157.H7 من اللحم والجبن والكشف عن جينات Stx1 و Stx2 و hlyA و eae A بأستخدام تقنية multiplex PCR . مجلة مركز بحوث التقنيات الاحيائية ,(عدد خاص)5 (2) : 15-24 .

الاتاسي، سيف الدين. (1998). الجمال بدلاً من الابقار – نشرة دورية الأبل. شبكة بحوث وتطوير الأبل. دمشق. سوريا. 14(4): 22-25.

الخزاعي, عروبة متعب. (2011). دراسة الكون البكتيري للحوم الطازجة في محلات القصابين في مدينة الديوانية, مجلة القادسية للعلوم الزراعية. (1) 1:1-7.

الراوي , خاشع محمود و خلف الله ,عبد العزيز محمد (2000). تصميم وتحليل التجارب الزراعية , الطبعة الثانية , دار الكتب للطباعة والنشر , جامعة الموصل , 488 صفحة .

ظاهر، فاهم حبيب و ضياء حسين عوني محمد و رقية مصطفى علي و محمد منير جميل (2010). تواجد بكتريا *Escherichia coli* O157.H7 في لحم البقر ومنتجاته والحليب ومنتجات الالبان في اسواق بغداد. المجلة العراقية لبحوث السوق وحماية المستهلك, 2 (4): 67 - 76.

عبد العالي, خليفة مفتاح ويوسف محمد الشريك ونوري الساحلي مادي ومحمد منصور الشريف.(2011). الكشف عن بعض البكتريا الممرضة في لحوم الابل الطازجة, المجلة الليبية للعلوم الزراعية. (16):1(2) :67-73.

محمد، زهير احمد و فادية عبد المحسن (2008). عزل وتشخيص جراثيم الايشيرشيا القولونية *E.coli* O157.H7 من لحوم الابقار المفرومة المحليــة والمستــوردة ولحم الدجــاج المستــورد. المجلة الطبيــة البيطريــة العراقيــة, 32(1) : 100-113.

AOAC . (1995). Confirmed total coliform and *E. coli* in all foods: Substrate supporting disc method. Sec. 17.3.07, Method 992.30. **In**: ***Official Methods of Analysis of AOAC International,*** 16th edition, P.A. Cunniff (Ed.), pp: 17-18. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Arabi, O. H.; Elmawlla, S. F.; Abdelhai, E.; Sulieman, A. M. E. and Ibrahim, N. A. (2014). Influence of season, age of animal and preservation period on microbial load of camel's meat. **Int. J. Curr. Microbiol. APP. Sci**., 3(11): 869-876.

Barnett , J.A. , (**2003)** .Beginningsof_the contribution of meatSgmjonrnals . **Org.Cgi._Funl** .149(3):227- 253.

Bell, C.(2002). Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC).**Int .J. Food Microbiol.,** 78: 197-216.

Benson, H. J. (2001). Microbiological application laboratory manual in general microbiology 8th editon, The Mc Grow-Hill Companies.

Blackburn, C. D. E. and Mccarthy, J. D. (2000). Modifications to methods for the enumeration and detection of injure *Escherichia coli* O157.H7 in foods. **Inf. J. Food Microbiol**., 55: 285-290.

Brandl, M. T. (2006). Fitness of human enteric pathogens on plants and implications for food safety. **Annual Review of Phytopathology** 44:367-392.

Cavi, U. Z. (2006). Detection of *Escherichia coli* O157: H7 from Beefdoner Kababs Sold in kars, **G. U. Journal of Science**. 19(2): 99- 104.

Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, J., and Zhao, S.(1997). *Escherichiacoli* O157:H7. **In** : Food Microbiology: Fundamentalsand Frontiers, ed. M.P. Doyle, L.R. Beuchat,and T.J. Montville, pp. 171–191. ASM Press,

Duncan, S.H.; Booth , I.R.; Flint, H.J. and Stewart, C.S. (2000). The potential for the control of *Escherichia coli* 0157 in farm animals. Joumal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 88, 1578-1658.

El-Safey, E. M. and Abdul-Raouf, U. M. (2003). Detection of *Esherichia coli* O157:H7 in some Egyptian foods, Assiut**. Journal of Agr. Science.** 34(6): 221-233.

Farmer, J. and Davis, B.(1985). Antiserumsorbitol fermentation medium : a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhaigc colitis. **J. Clin. Microbiol***.,* 22: 620-625.

Griffin, P. M.; Blaser, M. J.; Smith, P. D.; Favadin, J. I.; Greenberg, H. B. and Guerrant, T. R. L. (1995). Infections of the *E. coli* O157.H7 and other enterohemorrhagic *E. coli* gastrointestinal tract. New York**.** Raven Press, Ltd., 739-761.

Hensyl, W . R. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology 9th edition Williams and Wilkins, Baltimore, Philadelphia, Hong Kong, London, Munich, Tokyo.

Hitchins, A. D.; Feng, P.; Watkins, W. D.; Rippey, S. R. and Chandler, L. A. (1998). Bacteriological Analytical Manual. 8th ed., Chapter 9. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. AOAC.

Humphrey, S. I.; Grulet, D.; Le Gaff, F. and Chastel, C. (1991). *Spiroplasma* (mollicutes: Spiroplasmataceae) pathogenic for *Aedes aegypti* and *Anopheles Stephensi* (Diptera: Culicidae). Med. Entomol, 28(2(: 219-22.

Hussein, H. S. (2007). Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. **J Anim. Sci .**85: 63-72.

Macfaddin, J. F. (2000). Biochemical tests for identification of medical bacteria. The williams and wikins**.** Co. V. S. A., 912p

Nigatu, A .and Gashe, B.A. (1994). Survival and growth of selected pathogens in fermented kocho (Enseteventricosum). East African Medical Journal. 71:514-518.

Noveir, M. R. and Halkman, A. K. (2000). Astudy on selective broths and agars media for the isolation of *E.coli* O157.H7. serotype. **Turk. J. Vet. Anim. Sci.,** 24: 459-464.

Paton, J. C. and Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* Infection,. **Clin. Microbial . Rev**., 11(3):450-479.

Rangel, J.M.; Sparling, P.H.; Crowe, C.; Griffin, P.M. and Swards low, D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002**. Emerg. Infect. Dis.** 11(4):603-609.

ro, J. P.; Steriner, T. and Guerrant, R. L. (1998). Enteroag gregative *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis**., 4: 251-261.

Schwaiger,K.; Huther,S.; Hölzel,C.; Kämpf, P. and Bauer,J. (**2012**).Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat

purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. **Int J Food Microbiol**., 154(3): 206–211.

Scoters.S.; Aldridg, M. and Capps, K. (2000). Validation of a method for the detection of *E.coli* O157:H7. in foods. Food Control 11:85-95.

Shaw, W. G. A.; Smith, H. R.; Roberts, O. Well, J. T.; Cheasty, T. and Rowe, B. (1993). Examnation of beef for the presence of verocytoxin producing *Escherichia coli* particularly of thoseserotype O157. **J. App. Bacteriol**. 75: 420-426.

Shaw, W. G. A.; Smith, H. R.; Roberts, O.; Well, J. T.; Cheasty, T. and Rowe, B. (1993). Examnation of beef for the presence of verocytoxin producing *Escherichia coli* particularly of thoseserotype O157. **J. App. Bacteriol**. 75: 420-426.

Siham N. and Taha H. (**2009**). Superficial bacterial contamination of ovine and bovine carcasses at El–Harrach slaughterhouse (Algeria). **European Journal of Scientific Research,** 38(3):474 – 485.

SkrÖkki, A. (1997). Hygienic quality of commercial meat as indicated by aerobic micro-organisms and coliform bacteria. **Zlebensm Unters Forsch A**, 204:391-339.

SPSS (2009). Statistical package for window ver. 17.0.Chicago: ,Inc.

Temelli S, Eyigor A and Carli KT. (2012). Salmonella detection in poultrymeat and meat products by the Vitek immunodiagnosticAssay system easy *Salmonella* method, a LightCycler polymerasechai reaction system, and the International Organizationfor Standardization method 6579**. Poult Sci**;91:724–731.

USDA/FSIS: The office of public health and science in the U.S department of Agriculture's food safety and inspection service (2001). Interpretive summary risk assessment of the public health impact of *Escherichia coli* O157.H7 in ground beef. LaboratoryQuality Assurance Division , 17p.

Wilshaw, G.A., Cheasty, T., Smith, H.R.(2000). *Escherichia coli*. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (Eds.), The Microbiological Safety and

Quality ofFood II. **Aspen Publishers Inc., Gaithersburg, Maryland,** pp. 1136-1177.

Isolation and identification of *E.coli*o157:H7 bacteria and study the number of total coliform and *E.coli* in fresh beef meat in Basra city

Saher sabih george Nofeul Abud Al–Ameer Hussein Sabah Malik Habeeb AL–Shatty

Department of Food Science– Agriculture College–Basra university–Iraq

Summary

This study was conducted to detect the presence of bacteria *E.coli*o157:H7 and prepare coliform and *E.coli* by using the modern methods (petrifilm 3m), for fresh ground beef on five different areasin Basra city ,which is (Al –jazaaer– Abu alkhaseab – Zubair – Basra al kadema and Karmat Ali)during the period extended (January 2013 to desember 2013). Than obtained 27 positive isolation of bacteria *E.coli*o157:H7 from 540 samples of fresh ground beef .the rate are 5%and we adopted in the diagnosis of morphological examinations and biochemical test using Sorbitol MacConkey Agar ,API20E system and latex test. then we showed lowest spoilage of coliform bacteria in abu alkhaseab in feberuary is (1.53) cfu/g ,while the lowest of log number of *E.coli* in may (1.53) cfu/g. then shows significant differences between months and different areas on fresh ground beef .the most spoilage is in basra al kadema when compared with other areas in this study .