دراسة التلوث الميكروبي لبعض أنواع البسكت التجاري في مدينة بغداد

سالم صالح التميمي* خالد عبد الرزاق حبيب** إشراق جهاد خضير***

تاريخ قبول النشر 9 /6/2007

الخلاصـــة

أجريت هذه الدراسة لمعرفة مستوى التلوث بالأحياء المجهرية (البكتيريا والاعفان) في خمسة أنواع من البسكت المتوفرة في الأسواق المحلية في مدينة بغداد ، جمعت 50 عينة (بواقع 10 عينات لكل نوع من أنواع البسكت ، نوعان محليان والباقي تركي وإيراني وهولندي) للمدة ما بين شهر شباط إلى نهاية شهر نيسان لسنة 2004 . وكانت النتائج كما يأتي :

1 - بلغ أعلى عدد للبكتريا 21.6×10^3 خلية / غم في البسكت الإيراني وأقل عدد بمقدار 14.3×10^3 خلية / غم في البسكت المحلي رقم (1) . بينما بلغ أعلى عدد للاعفان 17.6×10^3مستعمرة / غم في البسكت الإيراني وأقل عدد في البسكت المحلي رقم (1) والذي بلغ 5.3×10^3 مستعمرة / غم .

2 - ظهرت البكتريا *Staphylococcus aureus* بأعلى نسبة في البسكت التركي حيث بلغت 100% بينما كانت بأقل نسبة في البسكت الهولندي حيث بلغت 37.28% ، في حين لم تظهر في البسكت المحلي رقم (1) . أما البكتريا *Bacillus cereus* فكانت نسبتها 100% في البسكت المحلي رقم (2) وبأقل نسبة في البسكت المحلي رقم (1) حيث بلغت 20.93% في حين لم تظهر في البسكت التركي. وأخيراً البكتريا *Escherichia coli* التي وجدت بأعلى نسبة في البسكت الهولندي حيث بلغت 38.98% بينما كانت بأقل نسبة في البسكت الإيراني حيث بلغت 28.16% في حين لم تظهر في البسكت المحلي رقم (1) و (2) والبسكت التركي .

3 - ظهر العفن *Aspergillus niger* بأعلى نسبة بلغت 66.66% في البسكت الهولندي بينما كانت بأقل نسبة في البسكت المحلي رقم (1) حيث بلغت 37.73% في حين كان البسكت المحلي رقم (2) خالي من هذا العفن . أما العفن *A. flavus* فقد بلغت أعلى نسبة له 69.76% في البسكت المحلي رقم (2) في حين كان بأقل نسبة في البسكت الهولندي حيث بلغت نسبته 8.33% ولم يظهر في البسكت الإيراني والتركي . وقد قدرت بأعلى نسبة للعفن *A.terreus* في البسكت التركي حيث بلغت 33.33% بينما لوحظ بأقل نسبة في البسكت المحلي رقم (2) حيث بلغت قيمته 11.62% ، في حين لم يظهر في البسكت الهولندي . وظهر العفن *Penicillium* spp. بأعلى نسبة في البسكت الهولندي بلغت 25% بينما ظهر بأقل نسبة في البسكت التركي بلغت 9.52% .

الكلمات المفتاحية: Fungi, Bacteria, Microbial Contamination Biscuits .

المقدمـــة

تعد البكتريا *Bacillus subtilus* أكثر الأنواع وجوداً في الطحين ومنتجاته كما تتواجد كل من بكتريا *Micrococcus* و *Escherichia coli* ، أما الأنواع *B. mesentericus ruber* و *B.mesentericus vulgaris* و *B.mesentericus fuscus* فهي أقل انتشاراً [1] . وقد ذكر[2] أن لزوجة الخبز ومنتجاته ترجع إلى أنواع البكتريا التي تعمل على تحليل المواد النشوية والبروتينية في الطحين بوساطة الأنزيمات المحللة للنشا والبروتين لتكون مواد لزجة في لب الخبز مما يؤدي إلى الهشاشة ولزوجة الملمس ، إذ تقوم البكتريا بتكوين المحفظات Capsules مما يؤدي إلى لزوجة القوام . كما ذكر [3] بأن أكثر أنواع البكتريا التي تسبب اللزوجة في الكيك والخبز هي *B. subtilius* و *B.pumilus* و *B.panis* والتي تؤدي إلى حدوث بعض التغيرات غير المرغوب فيها عند حفظ الخبز والمعجنات الأخرى . أشار [4] إلى أن وجود بكتريا *B.subtilius* يؤدي إلى تكوين المواد المسببة للزوجة الخبز والمعجنات .

وجد أن من الأسباب التي تؤدي إلى تلف الكيك قبل انتهاء تاريخ صلاحيته هي تكاثف الرطوبة على سطح الكيك بعد التعبئة لعدم تبريده بشكل كاف والى اختلاف درجات الحرارة بين موقع الإنتاج ودرجة حرارة مواقع التعبئة [5] .

وغالباً ما تعبأ المعجنات في علب أو حاويات بلاستيكية بعد الخبز والتبريد ، وتستهلك خلال شهر أو شهرين من تاريخ إنتاجها وأن معظم التلف الحاصل فيها هو نتيجة للتلوث بسبورات الاعفان المتأتية من الهواء خلال التبريد والتغليف [6] . يتراوح النشاط المائي لهذه المعجنات بين 0.70-0.85 لذلك فان الأعفان المتحملة للجفاف ومنها العفن *Aspergillus* لها القابلية على النمو في المعجنات المالحة أو الحاوية على السكر ،

*قسم الاقتصاد المنزلي-كلية التربية للبنات / جامعة بغداد
** قسم علوم الحياة-كلية العلوم للبنات / جامعة بغداد
*** جزء من رسالة ماجستير للباحث الأخير

وأن نموها الأمثل في المعجنات التي يتراوح أسها الهيدروجيني بين 6.5-6.8 وان درجة الحرارة المثلى لنموها من 22-25 م وان اكثر أنواع الاعفان التي تنمو على هذه المعجنات هي *Penicillium* و *Aspergillus* و *Eurotium* [7] .
تتعرض المعجنات ذات الشرائح الرقيقة والنشاط المائي 0.71-0.89 والأس الهيدروجيني 4.62-8.82 إلى التلوث من قبل الأعفان المتحملة للجفاف لتوافر درجة الحرارة والأس الهيدروجيني الملائمين لها ومن هذه الأعفان *Aspergillus* و *Penicillium* [8] . وتؤدي الفطريات المتحملة للجفاف إلى تقليل أو خفض مدة الخزن للمنتجات ذات الرطوبة المنخفضة مثل الطحين والمربيات والى إنتاج السموم الفطرية فيها اعتماداً على درجة الحرارة والمحتوى الرطوبي فيها ، كما يعتمد تلوث المعجنات بالأحياء المجهرية على عدة عوامل منها نسبة تلوث القالب ونوع المنتوج وطريقة التحضير والتعرض للجو أو من السطوح خلال عمليات التبريد وانتهاء التصنيع والتغليف [9] .
هدفت هذه الدراسة إلى معرفة مستوى التلوث بالأحياء المجهرية (البكتيريا والاعفان) في بعض أنواع البسكت المتوفرة في الأسواق المحلية في مدينة بغداد من خلال تقدير أعداد البكتريا والأعفان وأنواعها ونسب التلوث بها.

المواد طرائق العمل :

جمع العينات Samples Collection

جمعت خمسة أنواع من عينات البسكت المعروضة في الأسواق بواقع 10 عينات لكل نوع من مناطق مختلفة في مدينة بغداد شملت أسواق بغداد الجديدة , الكاظمية , الدورة , الكرادة وباب المعظم . نوعان من البسكت محلية الصنع هي 1و 2 وثلاثة أنواع مستوردة إيرانية وتركية وهولندية المنشأ , وضعت النماذج في أكياس من البولي أثيلين وحفظت في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م ثم استخدمت في اليوم التالي .

تجهيز العينة لغرض عد البكتريا والأعفان :

أخذت عينات عشوائية لكل نوع من البسكت وطحنت واخذ 50 غم لكل نوع على حدة ووضع في خلاط معقم بالكحول 70% والماء المقطر المعقم وأضيف لها 450 مل من محلول الفوسفات الدارئ phosphate buffer (pH 7) مزجت المكونات لمدة دقيقتين واخذ من هذا المعلق الذي يمثل التخفيف 10^{-1} حجم 1 مل وأضيف إلى 9 مل من محلول الفوسفات الدارئ حيث أجريت سلسلة من التخافيف العشرية تراوحت بين 10^{-1}– 10^{-8} لغرض عد مستعمرات البكتريا والاعفان [10] .وقد شملت :

العد الكلي للبكتريا :

أجريت تجارب أولية لمعرفة التخفيف وحجم المعلق البكتيري الذي يعطي أفضل النتائج وذلك باستخدام 0.1 و 0.5 و 1 مل من كل من التخافيف 10^{-1} إلى 10^{-8} وزرعت على وسط الآكار المغذي Nutrient agar باستخدام ثلاث مكررات لكل تخفيف وحضنت في درجة حرارة 28 م مدّة 24-48 ساعة ، اختيرت الأطباق الحاوية على 30 - 300 مستعمرة ، وقد لوحظ أن حجم المعلق 1 مل من التخفيف 10^{-3} أعطى أفضل عد بكتيري لجميع أنواع البسكت على وسط الآكار المغذي .

العد الكلي للأعفان :

استخدم وسط آكار البطاطا والدكستروز Potato Dextros Agar (PDA) ووسط آكار مستخلص الشعير Malt Extract Agar (MEA) , عقم الوسطان في الموصدة بدرجة حرارة 121 م وضغط 15 بار لمدة 15 دقيقة . عدل الأس الهيدروجيني إلى (4 - 4.5) باستخدام 10% حامض الهيدروكلوريك 0.01 عياري ، أضيف المضاد الحيوي الذي حضر بإذابة 500 ملغم من كلوروتترا سيكلين Chlorotetracyclin و 500 ملغم من كلورومفينيكول Chloromphenicole مع 100 مل محلول الفوسفات الدارئ ومزج الخليط جيداً قبل إضافته للوسط الزرعي . ثم أضيف 2 مل من الخليط إلى كل 100 مل من الوسط الخاص لتنمية الأعفان لتثبيط نمو البكتريا , ثم أجريت تجارب أولية كالتي أجريت في العد البكتيري المذكور أعلاه واختير التخفيف 10^{-3} والوسط (PDA) وحجم المعلق 1مل [11] .

تشخيص البكتريا

اختيرت عدة عزلات ممثلة للأطباق التي استخدمت لحساب العد الكلي للبكتريا بصورة عشوائية لكل نوع من أنواع البسكت المحلي والمستورد التي تمت دراستها ولجميع مدد الخزن لغرض تشخيصها ، حيث أجريت عملية تنشيط العزلات بزرعها في أنابيب اختبار حاوية على الوسط الزرعي الصلب بصورة مائلة slant لغرض استعمالها بمثابة مزرعة خزنية Stock culture وحفظت في الثلاجة في درجة حرارة 4 م لحين استخدامها ، وكانت تجرى عليها عملية تجديد كل ستة أسابيع .

الاختبارات المستخدمة في تشخيص البكتريا

الصفات الظاهرية للمستعمرات :

درست الصفات الظاهرية للمستعمرات البكتيرية كالشكل Shape والحجم Size والارتفاع Hight ونوع الحافة Margin والقوام Consistency وتكوين اللون Chromogenesis والشفافية Transparency وشكل البوغ Spore وموقعه .

اختبار الحركة بطريقة القطرة المعلقة Motility Test :

أخذت مسحة صغيرة من كل مزروع ووضعت على سطح غطاء شريحة زجاجية Cover glass تحتوي حافاتها على أربع نقط من الماء ، وعند وضع شريحة زجاجية خاصة مقعرة في الوسط فوق سطح غطاء الشريحة بحيث يكون التقعر يغطي القطرة . ضغط ضغطاً خفيفاً على الشريحة ليلتصق الغطاء بالشريحة وقلب بسرعة ليكون الغطاء الزجاجي للأعلى والقطرة المعلقة في تجويف الشريحة ثم فحصت بسرعة.

الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests :

الفحوصات الخاصة بالبكتريا *Staphylococcus* sp.:

بعد دراسة الصفات الظاهرية للمستعمرات البكتيرية أجريت الفحوصات الكيموحيوية آلاتية [12]:

1 - اختبار الكاتليز Catalase test :

استخدم هذا الفحص لتحديد إنتاج البكتريا الهوائية لأنزيم الكاتليز Catalase الذي يقوم بتحليل بيروكسيد الهيدروجين إلى الأوكسجين والماء . تم نقل جزء من المزروع البكتيري النامي على وسط الآكار المغذي عند درجة حرارة 37 م وبعمر 24 ساعة إلى شريحة زجاجية نظيفة واضيف إليها بضع قطرات من بيروكسيد الهيدروجين تركيز3 % ، النتيجة الموجبة دل عليها خروج الفقاعات الغازية من المستعمرات البكتيري [13].

2 - اختبار الأوكسيديز Oxidase Test :

استخدم هذا الفحص للتعرف على قدرة البكتريا في إنتاج أنزيم الأوكسيديز . خطط وسط الآكار المغذي بجزء من المزروع البكتيري وحضن مدّة 24 ساعة بدرجة حرارة 37 م ، ثم وضعت مستعمرة فتية على ورقة ترشيح مرطبة بوساطة الكاشف Tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride بتركيز 1% . يعد الكشف موجباً عند تلون المستعمرة باللون الأزرق الغامق أو البنفسجي خلال 5 - 10 دقائق [14] .

3 - الكشف عن كبريتيد الهيدروجين(H2S) :

لقح وسط Triple Sugar Iron Agar بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 م مدّة 48 ساعة . إن تكون اللون الأسود يعطي دلالة على إنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H2S .

4 - اختبار تفاعلات أحمر المثيل Methyl Red Reactions :

لقح الوسط مرق أحمر المثيل بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة ، وأضيفت بضع قطرات من محلول أحمر المثيل إلى الوسط. تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الأحمر[15] .

5 - اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin Hydrolysis test :

لقحت أنابيب وسط تحلل الجيلاتين بجزء من المزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة 37 م مدّة 24 ساعة ، لوحظ تحول الوسط من الحالة الصلبة إلى الحالة السائلة على الرغم من تبريده بدرجة حرارة 4 م مدّة نصف ساعة وهذا دلالة على إيجابية الاختبار الذي يدل على تولد أنزيم الجيلاتينيز Gelatinase المحلل للجيلاتين من قبل البكتريا [16] .

6 - اختبار تحلل النشا Starch Hydrolysis test :

لقحت أطباق وسط النشا بالتخطيط وحضنت عند درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة . ثم غمرت الأطباق بمحلول لوكال Lugal solution ، تعد النتيجة موجبة عند ظهور منطقة شفافة حول المستعمرات دلالة على إنتاج أنزيم الأميليز Amylase المحلل للنشا [16] .

7 - اختبار الأندول Indol test :

لقحت أنابيب الاختبار الحاوية على الوسط الزرعي ماء الببتون Peptone waterالحاوي على الحامض الأميني تربتوفان (Tryptophane) بجزء من المزروع البكتيري وحضنت عند درجة حرارة37 م مدّة 24 ساعة ، ثم أضيف 5 قطرات من كاشف كوفاك Kovac's reagent إلى أنابيب الاختبار ورجت بلطف ، أن ظهور الحلقة الحمراء على سطح الوسط دلالة على إنتاج الأندول من قبل البكتريا [14, 16] .

8 - اختبـــار فـــوكس بروســـكور Voges Proskouer test :

لقحـت أنابيـب الاختبـار الحاويـة علـى الوسـط بجـزء مـن المـزروع البكتيـري وحضـنت الأنابيب عند درجة حرارة 37 م لمدة 48 ساعة ، بعد ظهور النمو أخذ 1 مل من المزرعة إلى أنبوبة اختبـار معقمـة وأضـيفت إليـه 0.5 مـل مـن α -naphthol و 0.5 مل من محلول هيدروكسيد البوتاسيوم ورج المحلول وترك مدّة 15 دقيقة .تعد النتيجة موجبة عند ظهور اللون الوردي المائل إلى الأحمر دلالـة علـى إنتـاج الأسـتيل مثيـل كـاربينول Acetyl methyl carbinol .

9 - اختبار تخمر السكريات Carbohydrate fermentation test

لقحت أنابيب الاختبار الحاوية على وسط تخمـر السـكريات بجـزء مـن المـزروع البكتيـري وحضـنت الأنابيـب عنـد درجـة حـرارة 37 م لمـدة 24 سـاعة ، تـم التعـرف علـى النتيجـة الموجبـة مـن خـلال مشـاهدة تجمـع الغـاز فـي الجـزء العلـوي مـن أنبوبة درهام Durhum tube بشكل مقلوب داخل أنبوبـة الاختبـار الـذي يـدل علـى قـدرة البكتريـا علـى تخميـر السـكر وانتـاج غـاز ثنـائي أوكسـيد الكـاربون Co_2 وانتـاج الحـامض الـذي يـدل علـى تكونـه تغيـر لون الوسط من الأحمر إلى الأصفر .

10 - النمو على وسط المانيتول الملحي Growth on Mannitol Salt Agar

لقحـت أطبــاق وسـط آكـار المـانيتول الملحـي (M.S.A.) الحاويـة علـى كاشـف الفينـول الأحمـر بجـزء مـن المـزروع البكتيـري ، حضـنت الأطبـاق بـدرجة حـرارة 37 م لمدة 24 ساعة . تعد النتيجـة موجبـة بتغيـر لـون الوسـط بالمنـاطق المحيطـة بالمستعمرة الناميـة مـن اللـون البرتقـالي إلـى اللـون الأصفر ، مما يدل علـى قـدرة البكتريـا علـى تخميـر سكر المانيتول [17] .

11 - اختبار أنزيم التجلط Coagulase test :

تم مـزج 0.5مل من بلازمـا بشـرية مـع 0.01 مـل مـن المـزروع البكتيـري الحـاوي علـى المكـورات العنقوديـة بعمـر 18 - 24 سـاعـة وحضـنت الأنابيـب عنـد درجـة حـرارة 37 م ، لوحظت النتيجة كل ساعة مدّة 4 ساعات من خلال تكون الخثـرة Clot بإمالـة الأنبوبة بلطف مما يدل علـى إنتـاج أنـزيم Coagulase مـن قبـل البكتريـا [14, 16] .

12 - اختبـــار تحلـــل اليوريــــا Urease Hydrolysis test :

اجـري هـذا الاختبـار للكشـف عـن قابليـة البكتريا على إنتاج أنزيم اليورييز Urease، حيث لقحت أنابيب الاختبـار الحاويـة علـى وسـط تحلـل اليوريـــا (كريســـتن Christens) بجـــزء مـــن المـزروع البكتيـري وحضـنت الأنابيـب عنـد درجـة حـرارة 37 م لمـدة 48 سـاعة ، لـوحظ تغيـر لـون الوسط من الأصفر إلـى الـوردي والـذي يعد دلـيلاً إيجابياً علـى إنتاج الأنزيم [16] .

الفحوصات الخاصة بالبكتريا *Bacillus* sp.:

درسـت الصـفات الظاهريـة ثـم أجريـت فحوصـات الكيموحيويـة حسـب مـا جـاء فـي [18] والتي شملت :

1 - الوسط الانتقائي لبكتريا *B. cereus* :

لقحـت الأطبـاق الحاويـة علـى الوسـط Mannitol - egg yolk polymyxin agar (M.Y.P.) بجزء من المزروع البكتيري وحضنت عنـد درجـة حـرارة 32 م مـدّة 48 سـاعة ، تعـد النتيجة موجبة عند ظهور النمو في الوسط . إن هذا الوسط يلائم نمو الأنواع التابعة لجنس *B. cereus* ومـن ضـمنها *B. anthracis* و *B.thuringiensis* و *B. mycoides* .

2 - اختبار الكاتليز Catalase test :

3 - اختبار الحركة Motility test :

لقـح وسـط الحركـة شـبه الصـلب بطريقـة الطعـن stabbing وحضـنت الأنابيـب عنـد درجـة حـرارة 32 م مـدّة 48 سـاعة ، النتيجـة الموجبـة يستدل عليها بانتشار النمو فـي الوسط خـارج امتداد خط الطعن .

4 - اختبار فوكس بروسكور VP - test :

5 - اختبار أحمر المثيل Methyl red test :

6 - اختبار تخمر السكريات Carbohydrate fermentation test

7 - اختبار تحلل النشا Starch test :

كما جاء ذكره في الفقر 1، 8 ، 4 ، 9 ، 6 .

8 - اختبار تفكك الكازين Decomposition of Casein :

لقحـت أطبـاق وسـط آكـار حليـب الفـرز skim milk بـالتخطيط وحضـنت الأطبـاق علـى درجة حرارة 32 م مدّة 48 ساعة ، ظهور منطقة شـفافة تحت وحول المستعمرات دلالـة علـى إنتـاج أنـزيم البروتييز Protease وتفكك الكـازيين وتعد النتيجة موجبة .

9 - اختبار تحلل الجيلاتين Gelation analysis test :

كما جاء ذكره في الفقرة (5) .

10 - اختبار أنزيم الليسيثينيز Lecithinase test :

لقحت أطباق وسط آكار مح البيض Egg - yolk agar بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأطباق عند درجة حرارة 32 م مدّة 48 ساعة . ظهور منطقة معتمة من راسب ابيض حول المستعمرات البكتيرية تدل على إنتاج أنزيم الليسيثينيز Lecithinase من قبل البكتريا وهذه تعد نتيجة موجبة للاختبار .

11 - اختبار تحلل الدم Hemolysis test :

لقح وسط الآكار المغذي بالدم بجزء من المزروع البكتيري بطريقة التخطيط وحضنت الأطباق بدرجة حرارة 32 م مدّة 48 ساعة . تعد النتيجة موجبة عند ملاحظة مناطق تحلل الدم مما يدل على إنتاج أنزيم الكواكيليز Coagulase من قبل البكتريا.

12 - اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test :

لقحت أنابيب وسط سترات سيمون بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأنابيب عند درجة حرارة 32 م مدّة 48 ساعة ، تحول الوسط من اللون الأخضر إلى اللون الأزرق نتيجة استهلاك السترات بوصفه مصدر وحيد للكاربون من قبل البكتريا يعني أن النتيجة موجبة للاختبار .

13 - اختبار اختزال النترات Nitrate reduction test :

لقحت أنابيب وسط مرق النترات (5مل) بجزء من المزروع البكتيري وحضنت في درجة حرارة 32 م مدّة 3-7 أيام ثم أضيف لكل أنبوب 5 قطرات من محلول A (حضر باذابة 5 غم من ألفا تفثالين أمين في 100 مل من 30% حامض الخليك 5 عياري) و 5 قطرات من محلول B (حضر باذابة 8 غم من حامض السلفانيك في 100 مل من 30% حامض الخليك 5 عياري) ، إن ظهور اللون الأحمر يعني اختزال النترات Nitrate إلى نتريت Nitrite أما في حالة التفاعل السالب فيتم إضافة قليل من مسحوق الزنك ، فإذا تكون اللون الأحمر فان هذا يعني أن النترات ما زالت موجودة في الوسط وغير مختزلة بوساطة البكتريا ، وفي حالة غياب اللون الأحمر فان ذلك يدل على اختزال النترات إلى نتريت .

14 - النمو الجذري Rhizoid growth :

لقحت الأطباق الحاوية على وسط الآكار المغذي في مركز الطبق بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأطباق في درجة حرارة 32 مدّة 24-48 ساعة ، أن تكون النمو الجذري بظهور مستعمرات ذات تركيب تشبه الجذور قد تمتد لعدة سنتمترات من موقع التلقيح يعد نتيجة موجبة لهذا الاختبار .

15 - النمو في كلوريد الصوديوم :

لقح وسط كلوريد الصوديوم والمرق المغذي بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأنابيب في درجة حرارة 32 مدّة 24-48 ساعة ، ظهور النمو بشكل عكارة في الوسط يعد نتيجة موجبة للاختبار

16 - النمو في درجة حرارة 50 م :

لقحت أطباق وسط الآكار المغذي بجزء من المزروع البكتيري وحضنت الأطباق في درجة حرارة 50 مدّة 48 ساعة،ظهور النمو على الوسط يدل على النتيجة الموجبة .

الفحوصات الخاصة بالبكتريا السالبة لصبغة كرام:

درست الصفات الظاهرية الخاصة بهذه البكتريا ، ثم أجريت الاختبارات الكيموحيوية الآتية [19] :

1 - اختبار تحلل الجيلاتين Gelatin Hydrolysis test :
2 - الكشف عن كبريتيد الهيدروجين H_2S
3 - اختبار الأندول Indol test
4 - اختبار تحلل اليوريا Urea Hydrolysis test
5 - اختبار الأوكسيديز Oxidase test
6 - اختبار الكاتليز Catalase test
7 - اختبار فوكس بروسكور Voges Proskouer test
8 - اختبار استهلاك السترات Citrate utilization test
9 -اختبار الحركة Motility test
10- اختبار تفاعلات أحمر المثيل Methyl red reaction test كما ورد ذكره في الفقرة 5 ، 3 ، 7 ، 12 ، 2 ، 1 ، 8 ، 12 ، 3 ، 4.

النتائج والمناقشة

المحتوى البكتيري :

أظهرت نتائج تقدير المحتوى البكتيري لعينات الدراسة وجود اختلاف في أعداد الخلايا البكتيرية بين الأنواع المختلفة من البسكت ، حيث بلغ أعلى مستوى في البسكت الإيراني بمقدار 21.6×10^3 خلية / غم ، وأقل مستوى في البسكت المحلي رقم (1) حيث بلغ أعداد البكتريا 14.3×10^3 خلية /غم (جدول 1) . لقد تجاوزت هذه الأعداد الحد المسموح به عالمياً ضمن النوعية المقبولة والتي تقدر 1×10 خلية /غم بينما لا تتجاوز 1×10 خلية / غم في البسكت عالي الجودة [20] .

جدول (1) : أعداد المستعمرات البكتيرية في أنواع البسكت*

ت	نوع البسكت	أعداد المستعمرات × 10^3 / غم
1	بسكت محلي رقم (1)	14.33
2	بسكت محلي رقم (2)	17.33
3	بسكت إيراني	24.33
4	بسكت تركي	16.0
5	بسكت هولندي	19.66

- كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات .

الأنواع البكتيرية ونسبها :

عزل ثلاثة أنواع من البكتريا من عينات البسكت اثنان منها موجبة لصبغة كرام هما *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus* ، وواحدة سالبة للصبغة هي *Escherichia coli* . ظهرت البكتريا *S. aureus* بأعلى نسبة بلغت 100% و 79.06% و 39.43% و 37.28% في البسكت التركي والمحلي رقم (1) والايراني والهولندي ، على التوالي . تلتها بقية الأنواع البكتيرية (جدول 2) . أما بكتريا *E.coli* فقد ظهرت بنسبة أقل من الأنواع الأخرى . وهذا يتفق مع نتائج A [21] الذي ذكر أن الأنواع الكروية مثل *Micrococcus varians* و *S. aureus* تكون سائدة في الطحين ومنتجاته . كما أكدت دراسات أخرى وجود المجاميع البكتيرية العائدة للعوائل التالية *Micrococcaceae* و *Bacillaceae* و *Pseudomonadaceae* و *Lactobacillaceae* ومجموعة *Coliform* في الطحين ، حيث تلعب كل من البكتريا *S. aureus* و *E. coli* دوراً مهماً في التسمم الغذائي ، كما أن السموم المفرزة من قبل هذين النوعين من البكتريا لا يظهر أي تغيرات واضحة في النكهة والطعم أو المظهر الخارجي للمعجنات عند تركها لمدة طويلة في ظروف ملائمة لنمو هذه الأنواع البكتيرية[3,22].

جدول (2) : أنواع البكتريا ونسبها الموجودة في عينات البسكت المحلي والمستورد

ت	نوع البسكت	نوع البكتريا	النسبة المئوية%
1	البسكت المحلي رقم (1)	*Staphylococcus aureus*	79.06
		Bacillus cereus	20.93
		Escherichia coli	-
2	البسكت المحلي رقم (2)	*Staphylococcus aureus*	-
		Bacillus cereus	100
		Escherichia coli	-
3	البسكت الايراني	*Staphylococcus aureus*	39.43
		Bacillus cereus	32.39
		Escherichia coli	28.16
4	البسكت التركي	*Staphylococcus aureus*	100
		Bacillus cereus	-
		Escherichia coli	-
5	البسكت الهولندي	*Staphylococcus aureus*	37.28
		Bacillus cereus	23.72
		Escherichia coli	38.98

الصفات التشخيصية للبكتريا في عينات الدراسة :

الصفات المزرعية للبكتريا *Staphylococcus aureus* :

ظهرت عزلات هذه البكتريا ذات شكل كروي Cocci وخلايا متجمعة على شكل عناقيد Bunchy ، موجبة لصبغة كرام ، تنمو في ظروف هوائية ولا هوائية اختيارية ، غير مكونة للسبورات . وهذا يدعم كونها تعود إلى بكتريا *S. aureus* [1] . كانت الخلايا النامية على وسط المانيتول الملحي الصلب مع الآكار(M.S.A.) Mannitol Salt Agar ذات شكل دائري ولون كريمي لماعة , وحافاتها كاملة صقيلة الملمس ، كما لوحظ تغير اللون الوردي للوسط في المناطق المحيطة بالخلايا النامية إلى الأصفر وذلك لتغير لون كاشف الفينول الأحمر مما يدل على قابليتها على تخمير سكر المانيتول [17] .

جدول (3) : نتائج الاختبارات التشخيصية للبكتريا *Staphylococcus aureus*

ت	نوع الاختبار	النتيجة
1	الحركة	-
2	اختبار الكاتليز	+
3	اختبار الأوكسيديز	-
4	كبريتيد الهيدروجين	-
5	اختبار أحمر المثيل	+
6	تحلل الجيلاتين	+
7	تحلل النشا	-
8	اختبار الأندول	+
9	اختبار فوكس بروسكور	+
10	تخمر الكربوهيدرات	+
11	اختبار أنزيم التجلط	+
12	اختبار اليوريا	+
	التشخيص النهائي	***S. aureus***

(-) الفحص أو الاختبار سالب

(+) الفحص أو الاختبار موجب

كما أوضحت النتائج المبينة في جدول (3) أن البكتريا *S. aureus* كانت موجبة لاختبارات الكاتليز وتفاعلات أحمر المثيل وتحلل الجيلاتين وفحص الأندول وفوكس بروسكور وأنزيم التجلط وتحلل اليوريا وتخمر الكربوهيدرات . وسالبة لاختبارات الحركة وكبريتيد الهيدروجين والأوكسيديز وتحلل النشا [12] .

الصفات المزرعية للبكتريا *Bacillus cereus*

ظهرت الخلايا بهيئة عصيات كبيرة موجبة لصبغة كرام مكونة للابواغ بشكل بيضوي وذات موقع مركزي أو شبه مركزي هوائية أو لاهوائية جدول (4) . اشتركت جميع عزلات البكتريا *B.cereus* في كونها موجبة لاختبارات أنتاج الكاتليز والحركة وفوكس بروسكور واختبار أحمر المثيل وتخمر الكربوهيدرات (الكلوكوز) والنشا وتفكك الكازين وتحلل الجيلاتين وإنتاج الليسيثينيز ونمط تحلل الدم واستهلاك السترات واختزال النترات والنمو في 7% كلوريد الصوديوم ، وسالبة لاختبارات تخمر الكربوهيدرات الأرابينوز والزايلوز والمانيتول

وإنتاج الغاز والنمو الجذري والنمو في درجة حرارة 50 م [18] .

الصفات المزرعية لبكتريا *Escherichia coli* :

اظهر فحص الشريحة للخلايا التي أخذت من المستعمرات كانت سالبة لصبغة كرام ، عصوية صغيرة غير مكونة للابواغ , وتنمو في ظروف هوائية وغير هوائية ، ولها مدى واسع من درجات الحرارة تتراوح بين 10-46 م [19] .

أوضحت النتائج المبينة في جدول (5) أن عزلات البكتريا *E.coli* موجبة لاختيار النمو على وسط الدم ووسط ماكونكي والاندول والكاتليز وتفاعلات احمر المثيل والحركة وسالبة لاختبارات تحلل الجيلاتين وتحلل اليوريا والأوكسيديز وفوكس بروسكور واستهلاك السترات .

جدول (4) : نتائج الاختبارات التشخيصية لبكتريا *Bacillus cereus*

ت	نوع الاختبار	النتيجة
1	صبغة كرام	+
2	شكل البوغ	بيضوي
3	انتفاخ الحافظة البوغية	-
4	اختبار الكاتليز	+
5	الحركة	+
6	اختبار فوكس بروسكور	+
7	اختبار أحمر المثيل	+
8	الكلوكوز	+
9	الأرابينوز	-
10	الزايلوز	-
11	المانيتول	-
12	انتاج الغاز من الكلوكوز	-
13	تحلل النشا	+
14	تفكك الكازين	+
15	تحلل الجيلاتين	+
16	إنتاج الليسيثينيز	+
17	نمط حل الدم	B
18	استهلاك السترات	+
19	اختزال النترات	+
20	النمو الجذري	-
21	النمو في 7% كلوريد الصوديوم	+
22	النموفي 50 م	-
	التشخيص النهائي	***B. cereus***

(-) الفحص أو الاختبار سالب ، (+) الفحص أو الاختبار موجب

جدول(5) نتائج الاختبارات التشخيصية للبكتريا *Escherichia coli*

ت	نوع الاختبار	النتيجة
1	النمو على وسط أكار الدم	تنمو غير محللة للدم
2	النمو على وسط ماكونكي	تنمو مخمرة للاكتوز(وردي)
3	صبغة كرام	سالبة عصوية
4	تحلل الجيلاتين	-
5	فحص كبريتيد الهيدروجين	مخمرة (أصفر / أصفر)
6	اختبار الأندول	+
7	اختبار اليوريا	-
8	اختبار الأوكسيديز	-
9	اختيار الكاتليز	+
10	اختبار أحمر المثيل	+
11	اختبار فوكس بروسكور	-
12	اختبار استهلاك السترات	-
13	فحص الحركة	+
	التشخيص النهائي	***E coli***

(-) الفحص أو الاختبار سالب

(+) الفحص أو الاختبار موجب

محتوى الأعفان :

أظهرت النتائج المبينة في جدول (6) ارتفاع محتوى الأعفان في عينات البسكت المحلي والمستورد حيث تراوحت أعداد المستعمرات بين 5.3×10^3 مستعمرة / غم في البسكت المحلي رقم (1) إلى 17.6×10^3مستعمرة / غم في البسكت الإيراني . وهي أعلى من الحد المسموح بها حيث حددت [20] الحدود المسموح بها للنوعية المقبولة في البسكت بأن لا تتجاوز 5×10^2 مستعمرة / غم .ولم يلاحظ ظهور الخمائر في النماذج المفحوصة .

جدول (6) : أعداد الأعفان في البسكت المحلي والمستورد*

ت	نوع البسكت	عدد المستعمرات $\times 10^3$ / غم
1	بسكت محلي رقم (1)	5.3*
2	بسكت محلي رقم (2)	8.6
3	بسكت إيراني	17.6
4	بسكت تركي	7
5	بسكت هولندي	8

* كل رقم يمثل معدل لثلاث مكررات

أنواع الأعفان ونسبها :

أظهرت النتائج المبينة في جدول (7) عزل أربعة أنواع من الأعفان الخيطية من عينات البسكت المدروسة وهي *Aspergillus niger* حيث ظهرت بأعلى نسبة بلغت 66.66% و58.49% و57.14% و 37.73% في البسكت الهولندي والإيراني والتركي والمحلي رقم (1) ، على التوالي . تلته الأنواع *A. flavus* و *A. terreus* و *Penicillium* spp. ، على التوالي . وقد تم تشخيص الأعفان حسب المفاتيح التشخيصية المعتمدة من قبل [24] .

تتفق نتائج هذه الدراسة مع ما أشار إليه [25] اللذان وجدا أن النسبة الكبيرة من تلوث معامل صناعة المعجنات في الهند تعود إلى الأعفان *A.niger* و *A.versicolor* و*A.flavus* و *A.sydowi* و *A. fumigatus* و *A. japonicus* .

جدول (7) : أنواع الأعفان الموجودة ونسبها في عينات البسكت المحلي والمستورد

ت	نوع البسكت	نوع البكتريا	النسبة المئوية%
1	البسكت المحلي رقم (1)	**Aspergillus niger**	37.73
		A. flavus	18.87
		A. terreus	18.86
		Penicillium spp.	18.86
2	البسكت المحلي رقم (2)	*Aspergillus niger*	-
		A. flavus	69.76
		A. terreus	11.62
		Penicillium spp.	18.60
3	اليسكت الايراني	*Aspergillus niger*	58.49
		A. flavus	-
		A. terreus	26.41
		Penicillium spp.	15.09
4	البسكت التركي	*Aspergillus niger*	57.1`4
		A. flavus	-
		A. terreus	33.33
		Penicillium spp.	9.52
5	البسكت الهولندي	*Aspergillus niger*	66.66
		A. flavus	8.33
		A. terreus	-
		Penicillium spp.	25.0

وأهم الاستنتاجات التي توصلت إليها الدراسة هي أن أعلى عدد للبكتريا والأعفان كان في البسكت الإيراني في حين كان اقلها في البسكت المحلي رقم (1) . وظهرت البكتريا *S. aureus* بأعلى نسبة في البسكت التركي وبأقل نسبة لها في البسكت الهولندي في حين ظهرت البكتريا *B. cereus* بأعلى نسبة في البسكت المحلي رقم (2) وبأقل نسبة لها في البسكت المحلي رقم (1) . أما البكتريا *E.coli* فقد ظهرت بأعلى نسبة في البسكت الهولندي وبأقل نسبة لها في البسكت الإيراني . وظهر للعفنين *A. niger* و *Penicillium* spp بأعلى نسبة لهما في البسكت الهولندي في حين ظهر العفن *A. terreus* على نسبة في البسكت التركي .

المصادر

1- Frazier, W.c. 1967.Food Microbiology, 2nd. ed. Mc Graw-Hill Book Co.,N.Y.

2- Rogers, R.F. 1978. Bacillus is solated from refrigerated doughs, wheat flour and wheat. Cereal chem. 55:671-674.

3- الدليمي ، خلف الصوفي 1978. مايكروبايولوجيا الأغذية . مطبعة جامعة بغداد.

4- باقر ، عبد الواحد ،الراوي ، أنيس مالك ، العاني ، فاروق ياسر ، علي ، لوزان أمين ، عبد الغني ، زكي كوركيس و إبراهيم ، محمد عبد القادر 1984. البكتريا . جامعة بغداد – مطبعة وزارة التعليم العالي والبحث العلمي .

5- Beuchat, L.R and Hocking, A.D., 1990. Some consideration when analyzine foods for the presence of xerophilic fungi. J.Food prot.53 : 984-989.

6- Seiler, D. 1988. Microbiological problems associated with cereal based foods. Food Sci. Technol. Today. 2 : 37-41.

7- Pitt, J. I. and Hocking, A.D.1997. Fungi and food spoilage. Blackie Academic professional, London. P.339-366

8- Abellana, M.; Torrest, L. ; Sanchis, V. and Romos, A.J.1997. Caracterization de diferentes productos de bolleria industrial.II Estudio de Ia microflora, Alimentaria. 287 : 51-56.

9- Legan, J.D.1993. Mould spoilage of bread:The problem and some solutions. Int. Biodeterior. Biodegrad. 32 : 33-53.

10- American Public Health Association (APHA) .1976. Compendium of Method for the Microbiological Examination of Food. Washington.

11- القطبي ، سحر حسن علي 1999 .الخمائر والأعفان في بعض منتجات الألبان . رسالة ماجستير – كلية الطب البيطري – جامعة بغداد .

12- Kiss,I.1980. Testing Methods inFood Microbiology. Akademiai Kiado, Hungry, Amsterdam.

13- Nester,E.W.; Anderson, P.G.; Roberts, G.E.; Pearsall, N.N. and Nester, M.T. 2001. Microbiology Ahuman Prespective. 3th. ed. McGraw-Hill Higher Companies,New York.

14- Baron,E.J. and Fingold,J.E.1994. Diagnostic Microbiology. 9th .ed.The C.V.Mosby Company. Baltimor.

15-Jack,L. 1980. Laboratory microbiology.3 rd. ed,W.B. Saunders Company, London.

16- Atlas, R.M.; Lawrence, C.; Parks, A. and Brown, E. 1995. Laboratory Manual of Expermintal Microbiology. C.V.Mosby Company Inc. London.

17- Jewetz,E.; Melinck,J. and Adelberg,E.1991. Revew of Medical Microbiology. 14th. ed. Libaireda,Liban.11th. ed.Mosby,Inc.

18- Harmon,S.M.1982. New Method for Differentiating Members of the *Bacillus cereus*. Association of Official Aanalytical Chemists.65 (5) :1134-1139.

19-Forbes,B.A; Sahm,D.F.; Welssfeld,A.S. and Bailey& Scott's.2002. Diagnostic Microbiology. 11th. ed. C.V. Mosby Company Inc. London.

20- المواصفة القياسية العراقية رقم 3725 2000، الحدود المايكروبايولوجية في الحبوب ومنتجاتها في الأغذية. الجهاز المركزي للتقييس والسيطرة النوعية – وزارة التخطيط – جمهورية العراق .

21- Awad, Y.N. 1969. Studies on the microbiology of Balady bread making in Cairo area.M.Sc.Thesis, Faculty of Agric.,Cairo University.

22- الدليمي ، خلف الصوفي 1976. التسمم الغذائي . مطبعة جامعة بغداد .

24- Raper, K.B.; Fennell, D.I. and Austwiek,P.K.C.1965. The Genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. U.S.A.

25- Singh,A. and Singh,A.B.1999. *Aspergillus Spp*. As an important occupational risk factor among susceptible in dividuals. Aerobiologia. 15 (3) : 233-240.

Microbial Contamination in Some Commercial Biscuits in Baghdad City

Salim S. AL-Timimi*   Kalid A. Habib.**   Eshraq J. Khathier*

*Department of Home Economic- College of Education for Women /University of Baghdad.
** Department of Biology – College of Science for Women/ University of Baghdad

Abstract

This study has been conducted to know the level of microbial (bacteria and fungi) contamination in 5 types of biscuits from local markets of Baghdad city. Fifty samples (ten sample for each kind of biscuit) were studed,Two are local,others are Iranian,Turkish,and Holandies.

The following results have been achieved :

1. The highest number of bacteria was 21.6×10^3 cell/g in Iranian biscuit while the lowest number was 14.3×10^3 cell/g in local biscuit No.1 . The highest number of fungi was 16×10^3 colony/g and the lowest number was 5.3×10^3 colony/g in the Iranian and the local biscuit No.1,respectively.

2. *Staphylococcus aureus* was the major bacteria appeared at highest level of 100% in Turkish biscuit. The lowest percentage was found in Hollandian biscuit with 37.28%. *Bacillus cereus* was the major bacteria with a percentage of 100% in local biscuit No.2 where as the lowest was in local biscuit No,1with a percentage of 20.93%, while it was not existed in Turkish biscuit. *Esherichia coli* was found in Hollandian biscuit at highest rate of 38.98% , the lowest value was appeared in Iranian biscuit with *28.16%* while it was not exited in local biscuit No.1,2 and Turkish biscuit.

3. *Aspergillus niger* appeared at highest level of 66.66% in Hollandian biscuit, while was the lowest 37.73% in local biscuit No.1 and not existed in local biscuit No.2, The highest value of *A.flavus was* 69.76% in local biscuit No.2 and the lowest value in Hollandian biscuit in percentage 8.33%. It has not appeared in Iranian and Turkish biscuit. The *A. terreus* appeared at highest rate in Turkish biscuit with 33.33% , the lowest value was in local biscuit No.2 at 11.62% and was not appeared in Hollandian biscuit.The *Penicillium spp.* Was found at highest rate 25% in Hollandian biscuit , the lowest value of 9.52% was appeared in Turkish biscuit.