Isolation and Identification of Microorganisms from Raw Beef Meat Obtained from Different Markets in Hilla City

عزل وتشخيص الاحياء المجهرية من لحوم الابقار الخام في الاسواق المحلية في مدينة الحلة

غدير حاكم هادي صالح **فاطمة حمد كشاش شمران**

بأشراف : ا. صابرين عبد الامير كمال

Abstract : **الخلاصة :**

25 عينة لحم تم جمعها من المحلات الخاصة ببيع اللحوم في مدينة الحلة لغرض دراسة التلوث المايكروبي (النمو البكتيري والفطري) المرافق لتلك العينات , واظهرت النتائج وجود عينات كانت سالبة من حيث عدم وجود أي نمو بكتيري على الاوساط التشخيصية الثلاثة المستخدمة لنمو البكتريا وهي (MSA , EMB , S-S AGAR) , فقد لوحظ وجود 5 عينات لم يظهر عليها نمو مايكروبي عند استخدام الوسط MSA , في حين لوحظ وجود 3 عينات لم يظهر عليها نمو مايكروبي عند استخدام الوسط EMB ,اما وسط S-S AGAR فقد كانت هناك 12 عينة لم يظهر عليها نمو . فقد وجدنا عند استخدام الوسط MSA كانت نسبة الظهور لبكتريا *Staphyllococcus aureus* 32% بينما بكتريا *Staphyllococcus epidermidis* فكانت 48% ونسبة 20 % من العينات لم يظهر فيها نمو , اما عند استخدام وسط EMB فكانت نسبة الظهور لبكتريا *Escherichia coli* هي 16% ونسبة الظهور لبكتريا ***Klebsiella*** هي 56% اما العينات التي لم تظهر نمو فقد كانت نسبتها 12% على وسط EMB , اما باستخدام وسط S-S AGAR فقد كانت نسبة ظهور بكتريا *Shigella* 32% ونسبة ظهور بكتريا E. coli بنسبة 20% اما العينات التي لم يظهر فيها نمو فقد كانت النسبة 48% . اما بالنسبة للفطريات التي تم عزلها فكانت النتيجة على وسط PDA ظهور الفطر *Aspergillus niger* و *Penicillium expansum* و *Aspergillus fumigatus* بنسبة 75 و 17 و 8 % على التوالي , اما على الوسط SDA فكانت نسبة الظهورعلى التوالي لكل من *Penicillium expansum* و *Aspergillus niger* و *Aspergillus flavus* 70و28 و 2% , اضافة الى نسبة كبيرة جدا من خمائر ال *Candida* و *Rhodotorula* على الوسطين .

Introduction : المقدمة :

الأطعمة ، بطبيعتها ، مغذية وسهلة الأيض ، وبالتالي تقدم مادة اساسية مغذية لنمو وايض الكائنات الحية الدقيقة. الأمراض التي تنتقل عن طريق الأغذية هي مشكلة منتشرة تتسبب عن طريق استهلاك المواد الغذائية والعصائر والمياه الملوثة ويطلق عليها ايضا امراض التسمم الغذائي الذي تسببه البكتريا والفايروسات والفطريات التي تلوث تلك الاغذية (Thanigaivel, 2015) , حيث تعد هذه الامراض مشكلة رئيسية للصحة العامة التي تؤدي الى ارتفاع معدلات الامراض والوفيات في العالم , اللحوم يقصد بها اللحم الحيواني المشتق من أنواع محددة من الثدييات (الابقار) التي تستخدم كغذاء للاستهلاك البشري ويقصد بها عضلات الهيكل العظمي والدهون المرتبطة بها لهذه الحيوانات , واللحوم من الحيوانات السليمة خالية من الكائنات الحية الدقيقة

بطبيعة الحال , لكن هذه الكائنات التي تسبب فساد الأطعمة اللحمية إما موجودة وقت الذبح ، أو تدخل من قبل العمال او أدوات الذبح الخاصة بهم ، أو بالماء والهواء في غرف الملابس والتبريد والتقطيع (Thanigaivel ,2015). عادة ما يحتوي المسلخ على مجموعة متنوعة من مصادر تلوث اللحوم بالبكتيريا ، مثل الجلد والشعر والحوافر ، بالإضافة إلى محتويات السبيل الهضمي لهذه الحيوانات , كما ان الفضلات هي مصدر رئيسي للتلوث عن طريق الاتصال المباشر وغير المباشر معها (Thanigaivel ,2015) , في العراق تذبح الحيوانات يدويا لذلك تكون ملوثة بأنواع مختلفة من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات حتى الطفيليات من التربة أو من الأرض الملوثة بالمخلفات الأخرى (AL-Anbagi ,2020) . و تعد اللحوم بيئة مثالية لنمو العديد من الكائنات الحية لأنها تحتوي على نسبة عالية من الرطوبة وغني بالمركبات النيتروجينية مثل (الأحماض الأمينية والببتيدات والبروتينات) ومزودة بكثرة بالمعادن و وعوامل النمو الاخرى , يمكن للحوم مثل اي طعام ان تنقل بعض الامراض لكن الطهي الجيد وتجنب اعادة تلوثها بعد الطهي يقلل من هذه الاحتمالية (Thanigaivel ,2015) , هذه الدراسة تهدف لمحاولة دراسة الملوثات المايكروبية للحوم المباعة في الاسواق المحلية في مدينة الحلة .

المواد وطرائق العمل : Materials &Methods

1- جمع العينـــــات : 1-Collection Sample:

من مجموع 25 عينة لحم خام (بوزن 10 غم) تم جمعها من الاسواق المحلية في مدينة الحلة (الاماكن المخصصة لبيع اللحوم) تم جمع العينات للفترة من شهر شباط الى شهر اذار , ووضعها في اكياس جافة ومعقمة ووضعت العينات في الثلاجة تحت التجميد لحين جلبها الى مختبر الاحياء المجهرية / قسم علوم الحياة / كلية العلوم للبنات / جامعة بابل واجراء طرائق العزل عليها .

2- تحضير عينات اللحم : 2- Meat sample preparation:

كل عينة لحم وزنها (10 غم) وضعت في وسط ماء الببتون peptone water (100 مللتر) المحضر مسبقا " وفقا" للتعليمات على العبوة , وتركت فيه لمدة 15 دقيقة (AL-Anbagi ,2020).

3- الاوساط الزرعية المستخدمة للعزل : 3- Culture media:

1. Mannitol salt agar (MSI) :

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة Hi Media company Laboratories بأذابة (111 غم) من المادة في 1 لتر من الماء المقطر المعقم وبعد ذلك تم تعقيمه بجهاز الاتوكليف , يستخدم هذا الوسط للتحري عن بكتريا السالبة كرام (حيث ان الموجبة لاتستطيع النمو عليه) , المخمرة للمانتول ودليل التخمر هو تحول لون الوسط من الاحمر الى الاصفر , وهو ذو تركيز

ملحي عالي 7,5% يمكن تشخيص بكتريا *Staphyllococcus aureus* حيث تعطي لون اصفر , و *Staph. Epidermidis* تعطي لون وردي و *E.coli* لاتستطيع النمو عليه .

2. Eosin methylene blue (EMB) :

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة Hi Media company Laboratories وذلك بأذابة (35.69غم) من المادة في 1لتر من الماء المقطر المعقم وبعد ذلك تم تعقيمه بجهاز الاتوكليف , يستخدم هذا الوسط للتحري عن البكتريا السالبة لكرام لانه يحتوي على صبغة سامة للبكتريا الموجبة لكرام اضافة الى صبغتي الايوسين والمثيلين بلو التي تميز بكتريا الكوليفورم coliform bacteria من اكثر البكتريا شيوعا التي يمكن تشخيصها على هذا الوسط هي *E.coli* التي تنمو بلون اخضر لماع green metallic sheen و *Klebsiella* التي تظهر بلون وردي وتكون لزجة اما *Salmonella* و*Shigella* تظهر بلون اصفر فاتح الى بيجي .

3. Salmonella-Shigella agar(S-Sagar) :

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة Hi Media company Laboratories بأذابة (63 غم) من المادة في 1لتر من الماء المقطر المعقم وبعد ذلك تم تعقيمه بجهاز الاتوكليف , يستخدم هذا الوسط للتحري عن بكتريا السالبة لصبغة كرام حيث يثبط نمو الموجبة لكرام واساس عمل الوسط هو قدرة البكتريا النامية عليه من انتاج H2S من عدمه فمثلا بكتريا *Salmonella* تكون منتجة لكبريتيد الهيدروجين وغير مخمرة للاكتوز فيبدو لونها اسود على الوسط و *Shigella* يكون لونها عند النمو بيجي وهي غير منتجة للغاز , *E . coli* تنمو بلون وردي وغيرها من البكتريا .

4. Sabouraud dextrose agar (SDA) :

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة Hi Media company Laboratories بأذابة (65 غم) من المادة في 1لتر من الماء المقطر المعقم وبعد ذلك تم تعقيمه بجهاز الاتوكليف , وبعد اكتمال عملية التعقيم يتم اضافة المضاد الحيوي الكلورامفنيكول , يستخدم هذا الوسط للتحري عن الاعفان والخمائر في العينات .

5. Potatoa dextrose agar(PDA) :

حضر الوسط حسب تعليمات الشركة المصنعة Hi Media company Laboratories بأذابة (39 غم) من المادة في 1لتر من الماء المقطر المعقم وبعد ذلك تم تعقيمه بجهاز الاتوكليف , وبعد اكتمال عملية التعقيم يتم اضافة المضاد الحيوي الكلورامفنيكول , يستخدم هذا الوسط للتحري عن الاعفان والخمائر في العينات .

4- Diagnosis of isolated microorganisms : 4- تشخيص الاحياء المجهرية المعزولة :

1 - Diagnosis isolated bacteria: 1- تشخيص البكتريا المعزولة :

تم استخدام الاوساط الغذائية كأوساط تشخيصية للبكتريا المحتمل تواجدها في العينات حيث ان هذه الاوساط تعتبر تفريقية ويمكن الاعتماد عليها في التشخيص اضافة الى التصبيغ بصبغة كرام واجراء اختبار catalase وال oxidase وتخمر الكاربوهيدرات كاختبارات للتأكيد , حيث ان وسط MSA يستخدم لتشخيص *Staphylococcus aureus*, وسط EMB يستخدم للتحري عن بكتريا *Escherichia coli, klebsiella* , وسط S-S AGAR يستخدم للتحري عن بكتريا *Salmonella* and *Shigella* (Thanigaivel ,2015).

2 - Diagnosis of fungi: 2- تشخيص الفطريات المعزولة :

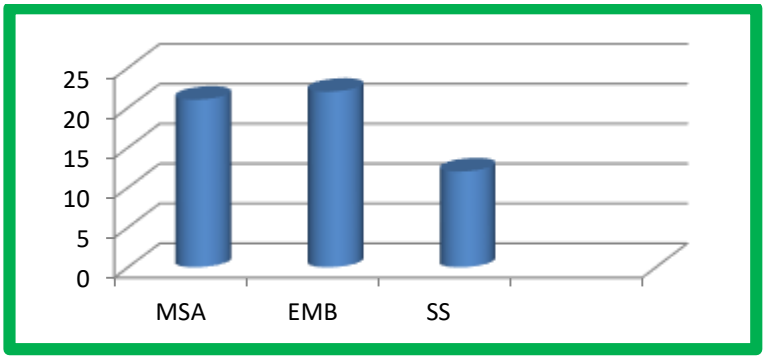
تم الاعتماد في تشخيص الاجناس الفطرية المعزولة على الصفات المظهرية والمجهرية , حيث شملت الصفات المظهرية (لون المستعمرة , شكل المستعمرة , سطح المستعمرة) اما الصفات المجهرية فقد اعتمدت على (شكل الغزول الفطرية , مقسمة او غير مقسمة , والسبورات) بعد تصبيغ العينات بصبغة اللاكتوفينول كوتون بلو lactophenol cotton blue (Barnett et al. , 1972) .

Result & Discussion: النتائج والمناقشة :

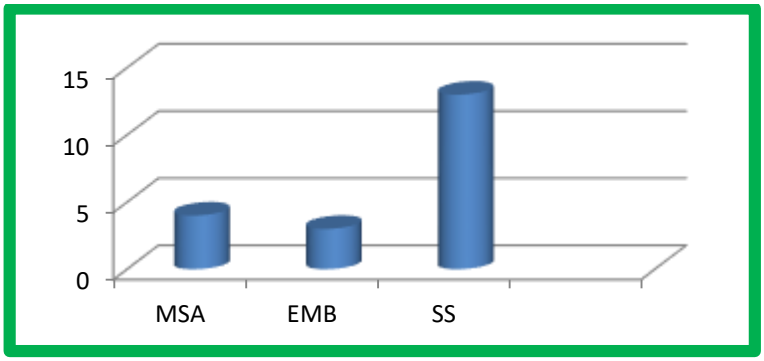
25 عينة لحوم (لحم ابقار) تم جمعها من الاسواق المحلية (محلات القصابة) في مدينة الحلة لفحص وجود مسببات الأمراض البكتيرية والفطرية , حيث كانت العينات ملوثة بشدة بالمسببات المرضية حسب ما اظهرت النتائج , فنجد عند تشخيص البكتريا الملوثة كانت نتائج النمو على وسط EMB (Euosin Methylene Blue) 22 عينة لحم نمت عليها البكتريا مقابل 3 لم تنمو عليها , اما وسط MSA(Manitol Salt Agar) 21عينة لحم نمت عليها البكتريا مقابل 4 لم تنمو عليها , ووسط SS Agar (Salmonella Shigella agar) 12 عينة لحم نمت عليها البكتريا و13 عينة لم تنمو عليها .

جدول (1) : يشير إلى وجود أو عدم وجود نمو بكتيري وفقًا للاوساط الزرعية التفريقية المستخدمة .

الوسط الزرعي المستخدم	وجود نمو بكتيري	عدم وجود نمو بكتيري
Mannitol salt agar (MSA)	**20**	**5**
Eosin methylene blue(EMB)	**22**	**3**
Salmonella –Shigella agar (S-S)agar	**13**	**12**



مخطط(1) : يشير إلى وجود نمو بكتيري حسب الاوساط الزرعية المستخدمة .



مخطط(2) : يشير إلى عدم وجود نمو بكتيري حسب الاوساط الزرعية المستخدمة .

جدول (1) يبين وجود و عدم وجود نمو بكتيري في العينات المدروسة وحسب الاوساط التفريقية المستخدمة للتمييز بين البكتريا , وهذا ممكن ان تكون العينات غير ملوثة اوان الاشخاص العاملين قد يكونوا مهتمين بشروط النظافة والسلامة اثناء العمل , الاهتمام بنظافة الادوات المستخدمة و محل العمل والتخلص من الذباب , كما قد يكون وقت نفاذ اللحوم من محل العمل وقتا" سريعا" وغيرها من الاسباب (Hassan et al. ,2018), وذلك لان وجود البكتريا في لحوم البقر يمكن أن تسبب تلف اللحوم والتسمم الغذائي , حيث تعتبر اللحوم فاسدة عند تغير اللون و / أو الرائحة و / أو تكون مادة مخاطية وهذه التأثيرات عادة ما تسببها البكتيريا نظرا لأن لحم البقر غني بالمغذيات ويحتوي على نسبة عالية من الماء ، ويتأثر نمو البكتيريا على اللحوم بدرجة الحرارة ودرجة الحموضة والنشاط المائي وتوافر المغذيات وجو التخزين والمنافسة من الكائنات الحية الأخرى ويمكن أن تؤثر التغييرات الصغيرة في هذه العوامل بشكل كبيرعلى التلف حيث تسمح هذه التغييرات للكائنات الحية الدقيقة من استعمار لحم البقر بسهولة ولهذا يجب اتباع وتبني شروط سلامة صحية صارمة للتخلص من النمو البكتيري الذي يكون بتماس مباشر مع صحة المستهلك سواء اثناء الحمل لهذه اللحوم او التسويق او الخزن (BIOHAZ, 2016) .

اما البكتريا التي تم عزلها من عينات اللحوم وحسب الاوساط المستخدمة فظهرت النسبة كما في الجدول (2) .

جدول (2) : يظهر انواع البكتيريا التي تم عزلها من عينات اللحم حسب الاوساط الزرعية المستخدمة .

الوسط الزرعي المستخدم	نوع البكتريا المعزولة	عدد العزلات	النسبة المئوية
MSA	*Staphyllococcus aureus*	8	%32
MSA	*Staphyllococcus epidermidis*	12	%48

%20	5	No growth	MSA
%16	4	*Escherichia coli*	EMB
%56	14	*Klebsiella*	EMB
%12	3	No growth	EMB
%32	8	*Shigella*	S S
%20	5	*E. coli*	S S
%48	12	No growth	S S

حسب النتائج التي ظهرت في الجدول (2) نلاحظ ان عدد العينات التي ظهرت فيها عزلات بكتريا *Staph. aureuas* التي تم عزلها على وسط MSA كانت بنسبة 32% فيما كانت عدد العينات التي ظهرت فيها عزلات *Staph. epidermidis* 48%, بينما عدد العينات التي لم يظهر فيها نمو على وسط MSA كانت بنسبة 20 % , اما الوسط الزرعي EMB فقد كانت عدد العينات التي ظهرت فيها عزلات بكتريا *E.coli* بنسبة 16% , وعدد العينات التي ظهرت فيها عزلات بكتريا *Klebsiella* فكانت بنسبة 56% , اما العينات التي لم تظهر نمو على وسط EMB فكانت بنسبة 12 % , واخيرا كانت عدد العينات التي ظهرت فيها عزلات بكتريا *Shigella* كانت بنسبة 32% , وعدد العينات التي ظهرت فيها بكتريا *E.coli* كانت بنسبة 20% اما العينات التي لم يظهر فيها نمو فكانت نسبتها 48% على هذا الوسط ..

ان وجود البكتريا المختلفة في اللحوم قد تم تسجيله في اماكن مختلفة من العالم واجريت عليه دراسات كثيرة في عدة دول ومنها العراق وفي عدد من المحافظات وعليه من خلال النتائج المتحصل عليها يمكن القول بأن الاسواق العراقية قد غزتها انواع الاطعمة ومنها اللحوم من مصادر معروفة ومجهولة دون الاخذ بعين الاعتبار ان كانت هذه الأطعمة تصلح للاستهلاك البشري او لا تصلح , اضافة الى عدم وجود المتطلبات المناسبة لنقل وتخزين وتسويق هذه المواد الغذائية , اضافة الى عدم اتباع شروط السلامة الصحية مما يؤدي إلى تلوث الطعام بمختلف الملوثات الفيزيائية ، الكيميائية والبيولوجية وبالأخص بكتريا القولون (Hassan et al. , 2018) .

جدول (3) : يظهر انواع الفطريات التي تم عزلها من عينات اللحم حسب الاوساط الزرعية المستخدمة .

SDA		PDA		الفطريات المعزولة
النسبة المئوية	**عدد العزلات**	**النسبة المئوية**	**عدد العزلات**	
28%	**25**	**75%**	**50**	*Aspergillus niger*
	0	**8%**	**5**	*Aspergillus fumigatus*
2%	**5**	**0**	**0**	*Aspergillus flavus*
70%	**63**	**17%**	**11**	*Penicillium expansum*
	More		**More**	*Candida*
	little		**little**	*Rhodotorula*

من الجدول(3) اعلاه نلاحظ عند استخدام الوسط الزرعي PDA ان الفطر *Aspergillus niger* سجل اعلى نسبة ظهور بين الانواع الاخرى وبنسبة 50% تلاه الفطر *Penicillium expansum*

وبنسبة ظهور 17% واخيرا الفطر *Aspergillus fumigatus* وبنسبة ظهور 5% , اما الوسط SDA فكانت اعلى نسبة ظهور للفطر *Penicillium expansum* *وبنسبة 70%* يليه الفطر *Aspergillus niger* *وبنسبة 28 %* واخيرا" *Aspergillus flavus* وبنسبة *2%* , اضافة الى نسبة كبيرة جدا" من خمائر ال***Candida*** ***و Rhodotorula*** , ووجود هذه الخمائر والاعفان في اللحوم دليل على انها غير جيدة وذلك بسبب قدرة هذه الخمائر والاعفان على افراز سموم ايضية في القناة المعدية المعوية مما يؤدي الى اعتلالها , وكذلك تؤثر التفاعلات العديدة بين الفطريات والبكتيريا والاستجابة المناعية المعقدة للفطريات المعدية المعوية أو المسببة للأمراض على الفيزيولوجيا المرضية لمرض التهاب الأمعاء و الالتهابات المعدية المعوية الأخرى مثل القرحة الهضمية , كما تساهم السموم الفطرية المتولدة كمستقلبات فطرية في اضطرابات الحاجز الهضمي ووظائف المناعة وترتبط بحالات التهاب الأمعاء المزمنة وكذلك سرطان الخلايا الكبدية والمريء المعدي(Wang et al , 2014) , وكذلك قدرتها على افراز انزيمات phospholipase lipase proteinase , الذي يساعدها في غزو القناة الهضمية (Richter et al. , 2005) .

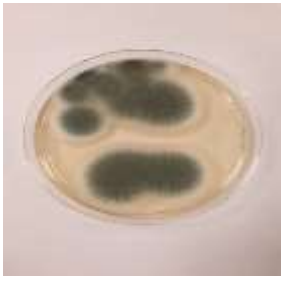
Aspergillus fumigatus

Aspergillus niger

Aspergillus flavus

Candida

Rhodotorulla



Penicillium expansum

الاستنتاج : **Conclusion :**

من هذه الدراسة نستنتج بأن تلوث اللحوم لايزال ويعد مشكلة صحية عامة وخاصة الغير مطبوخة (الخام) حيث تكون ملوثة وبشدة وفيها نسبة ظهور عالية للملوثات البكتيرية والفطرية , وبالتالي جميع احتياطات السلامة المناسبة أثناء تصنيع ومناولة وتخزين منتجات اللحوم هذه يجب تبنيها للسيطرة على هذه العوامل الممرضة الخطيرة وللحصول على الحد الأقصى من السلامة

للمستهلكين , كما نوصي باستخدام طرق اكثر تطور في تشخيص الملوثات , وكذلك اتباع طرق سليمة وصحية عند التعامل مع هذه اللحوم .

المصادر : **Referrences :**

1-Al-Anbagi jasim hadi ; Al-Khafaji Nazar Jabbar.2020.Isolation and identification of zoonotic importanc bacteria from meat , meat products and human in diyala , Iraq . plant archives , vol.20 , no. 2 , pp. : 8745-8755 .

2- Barnett, J.L. and Hunter, B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi, Burgess Publishing company, Minneapolis , Minn , USA. (1972) .

3- EFSA Panel On Biological Hazards (BIOHAZ) . 2016 . Growth of spoilage bacteria during storage and transport of meat . EFSA Journal . Vol.14 .issue 6 .

4-Hassan , Haifa'a ; Sadiq,Jenan nadhim ; Mohamed , Basima J .2018. Isolation and identification of some bacteria from imported meat (beef burger) by using vitek2 technique . QJVMS , Vol. 17 No.(2) 6 th (1 st international) scientific conference 27-28 Sep. 2017 .

5- Richter , R . C , Ledford , Ail and Murphy, S.C. (2005) . Compendium of methods for the microbiological examination of foods. America Public Health Association, washinton .D. C,chapter 45.pp.837-856..

6- Thanigaivel, Gayathri ; Anandhan, Anu Swedha . 2015. Isolation and characterization of microorganisms from raw meat obtained from different market places in and around Chennai . Journal of Pharmaceutical , chemical and biological scinces . 3(2) : 295-301.

7- Z K Wang , Y S Yang , A T Stefka , G Sun ,L H Peng .2014 . Review article: fungal microbiota and digestive diseases . Aliment Pharmacol Ther. 39(8):751-66. doi: 10.1111/apt.12665. Epub 2014 Feb 24.

Abstract :

25 meat samples were collected from meat shops in the city of Hilla for the purpose of studying microbial contamination (bacterial and fungal growth) accompanying those samples. EMB, S-S AGAR), it was observed that there were 5 samples that did not show microbial growth when using the MSA medium, while it was observed that there were 3 samples that did not show microbial growth when using the EMB medium, while the medium of S-S AGAR, there were 12 samples that did not show growth . We found that when using MSA medium, the percentage of emergence of Staphylococcus aureus was 32%, while Staphylococcus epidermidis was 48%, and 20% of the samples did not show growth, but when using EMB medium, the percentage of emergence of Escherichia coli was 16%, and the percentage of appearance of Klebsiella was 56%. As for samples that did not show growth, the rate was 12% on EMB medium, while using S-S AGAR medium, the percentage of Shigella bacteria appeared was 32%, and the percentage of E. coli appeared by 20%, while samples that did not show growth, the percentage was 48% . As for the fungi that were isolated, the result was the appearance of Aspergillus niger, Penicillium expansum, and Aspergillus fumigatus on PDA medium by 75, 17, and 8%, respectively, while on SDA medium, the percentage of appearance, respectively, of Penicillium expansum, Aspergillus niger, and Aspergillus flavus was 70 and 28. And 2%, in addition to a very large percentage of Candida and Rhodotorula yeasts on the two media .