**جامعة بنغازي**

**كلية العلوم**

**قسم النبات**

# التحليل البكتيري للمثلوجات Ice Creams المصنعة محليا في مدينة بنغازي

**مقدمة من**

**نادية سويحل جادالله العبيدي**

**أشراف الدكتور**

**محمد فرج الحاسي**

**قدمت هذه الأطروحة استكمالا لمتطلبات الحصول على الإجازة العليا ( الماجستير)**

2011-10-30

**جامعة بنغازي**

**كلية العلوم**

**قسم النبات**

# التحليل البكتيري للمثلوجات Ice Creams المصنعة محليا في مدينة بنغازي

**مقدمة من الطالبة**

**نادية سويحل جادالله العبيدي**

**لجنة المناقشة :**

**د.محمد الحاسي .....**

**( مشرفا )**

**أ.د.صالح حمد بعيو .....**

**( ممتحنا داخليا )**

**د. عمر سالم أبشيش .....**

**( ممتحنا خارجيا )**

**يعتمد**

| | |
|---|---|
| **د. سالم عبدالعالي الشطشاط** | **د. أحمد محمد مامي** |
| **رئيس قسم النبات** | **عميد كلية العلوم** |

**(وما توفيقي إلا بالله عليه توكلت وإليه أنيب )**

**سورة هود الآية 88**

# الإهداء

إلى والدي ووالدتي أهدي لهم ثمرة جهدي هذا حيث كانوا السند الأكبر وخير عون لي

للحصول على هذه الشهادة

إلى زوجي العزيز كل التقدير لدفعه لي لاستكمال بحثي

إلى أخواتي و إخوتي

إلى كل شهداء الوطن و أخص بالذكر الشهيد الشيخ أحمد أبوبكر المجبري

إليهم جميعاً أهدي هذا البحث المتواضع

# الشكر والتقدير

أتوجه بشكري لله عز وجل خالق الكون ومعين العباد على قضاء حاجاتهم كما أتقدم بخالص شكري وامتناني للدكتور محمد فرج الحاسي الذي أشرف على هذا البحث ولم يبخل علي بتوجيهاته و إرشاداته التي كانت عونا لي للاستمرار في متابعة هذا البحث ,

أتقدم بالشكر لكل أعضاء هيأة التدريس بقسم النبات وأخص بالشكر الدكتور سالم الشطشاط وفنيي المعامل وطلبة وطالبات قسم علم النبات.

كما أتقدم بخالص الشكر و التقدير للأستاذة سالمة الفايدي بكلية الطب وأية الفرجاني ومريم شعيتير وهند الفيتوري وحنان الحوتي وإيناس العقيلي و إيمان الحداد بمركز بنغازي الطبي وكما أخص بالشكر الأستاذة نعيمة العمامي .

# الملخص

# Abstract


تم تجميع 50 عينة من المثلوجات في ظـــروف صـــحية aseptically وخاليـــة مـــن الملوثات وتم إجراء العديد من التجارب البكتيريولوجية لعزل وتعريف أنواع البكتيريا الضارة المسببة لتلوث المثلوجات المصنعة محليا في مدينة بنغازي وهذه الأجناس والأنواع البكتيرية هي :

*Escherichia coli(17.5%) , Klebsiella spp.(15.4%) , Klebsiella oxytoca(0.9%) , Streptococcus spp.(11.8%), Streptococcus viridans(0.4%) , Streptococcus pneumoniae(0.4%) , Streptococcus pyogenes(0.9%), Staphylococcus spp.(10.8%), Staphylococcus aureus(7.0%), Staphylococcus epidermidis(0.9%), Staphylococcus cohnii(2.6%) , Salmonella spp.(10.08%) , Pseudomonas aeruginosa(5.3%) , Pseudomonas putida(0.9%), Shigella spp.(3.5%), Proteus spp.(3.1%), Enterococcus .faecalis(0.9%), Listeria spp.(0.9%), Yersinia spp.(7.0%) .*

لقـــــــد أتضح من خلال التجارب الروتينية ( التشخيصية ) أن أغلب العينات التي تم تحليلها جرثوميا ملوثة تلوثا بكتيريا كبيرا بنسب مختلفة . وإن هذه العينات لم تكـــن فـــي المستوى المطلوب من الناحية الصحية والنوعية حيث أثبتت الدراسة أن عمليـــات الســـلامة الصحية لم تؤخذ في عين الاعتبار عند تجهيز وتصنيع المنتج . إضافة إلى عدم وجود مراقبة دورية عن سير التجهيز . لقد تم عزل العديد من السلالات البكتيرية المختلفة التي تلعب دورا

مهما في فساد وتلوث المثلوجات حيث تلعب هذه السلالات البكتيرية دورا أساسيا في الإصابة بالأمراض . إن الاهتمام بعملية تصنيع المواد الغذائية يسهم بطريقة أو بأخرى في التقليل من مستوي انتشار الأمراض بين عامة الناس . لقد تبين من خلال هذه الدراسة أن المواد الخام الداخلة في عملية التصنيع ليست في المستوي المطلوب من ناحية نوعيتها ومدة انتهاء صلاحيتها إضافة إلى افتقار عمليات التخزين الجيدة . وكذلك أثبتت الدراسة أن أسس التلوث البكتيري ترجع في الأساس إلى إهمال العناية بالسلامة الصحية للعاملين مما أدى إلى زيادة نسب مستويات التلوث لكافة المنتجات المصنعة خصوصا في صناعة المثلوجات بالطرق اليدوية . كذلك وجود تلوث في آلات التصنيع والخلط بسبب عدم تطبيق إجراءات التطهير والتعقيم لتلك الآلات وفقا للأسس أو المعايير الصحيحة التي تمنع النشاط الجرثومي داخل ألآت التصنيع . وكذلك التلوث العالي لمصادر المياه التي يتم تزود المصانع بها مما ساهم في زيادة نسبة التلوث البكتيري في المثلوجات المُصنعة . كذلك أثبتت الدراسة أن أغلب البكتيريا المعزولة كانت من العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* . وفي النهاية نؤكد أن معظم المنتجات المصنعة محليا ليست في المستوى القياسي الجيد من حيث جودتها ونوعيتها الغذائية وكذلك نسب تلوثها جرثوميا خصوصا الأغذية المصنعة يدوياً .

# المحتويات

# Contents


| الموضوع | الصفحة |
|---|---|
| آية الافتتاح ..... | I |
| الاهداء ..... | II |
| الشكر والتقدير ..... | III |
| الملخص العربي ..... | IV |
| المحتويات ..... | VI |
| فهرس الجداول..... | VII |
| فهرس الأشكال ..... | VIII |
| 1 المقدمة ..... | 1 |
| 1.1 أمراض التسمم الغذائي ..... | 3 |
| 2 الدراسات السابقة ..... | 6 |
| 3 المواد وطرق العمل ..... | 13 |
| 1.3 الطرق العامة ..... | 13 |
| 2.1.3 طريقة تجميع العينات ..... | 14 |
| 3.1.3 عملية الزرع ..... | 14 |
| 4.1.3 التحضين ..... | 14 |
| 5.1.3 عزل العزلات البكتيرية ..... | 15 |
| 6.1.3 تعريف العزلات البكتيرية ..... | 15 |
| 7.1.3 حفظ العزلات البكتيرية ..... | 15 |
| 4 النتائج ..... | 17 |
| 5 المناقشة ..... | 54 |
| 6 الاستنتاجات ..... | 63 |
| 7 التوصيات ..... | 65 |
| 8 المراجع ..... | 67 |
| 9 الملخص باللغة الإنجليزية ..... | 71 |
| 10 الملاحق ..... | 73 |

# فهرس االجداول

# Index of tables


| الجدول | الموضوع | الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الأول..... | 18 |
| 2 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثاني..... | 31 |
| 3 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثالث..... | 37 |
| 4 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الرابع..... | 43 |
| 5 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الخامس..... | 48 |
| 6 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع السادس..... | 52 |

# فهرس الأشكال

# Index of Figures


| الشكل | الموضوع | الصفحة |
|---|---|---|
| 1 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Escherichia coli* على الوسط الغذائي MacConkey agar | 19 |
| 2 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Klebsiella.spp* على الوسط الغذائي MacConkey agar ..... | 20 |
| 3 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Enterococcus faecalis* على الوسط الغذائي Blood agar ... | 22 |
| 4 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Listeria.spp* على الوسط الغذائي Blood agar ..... | 23 |
| 5 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الأول ..... | 24 |
| 6 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Streptococcus pyogenes* على الوسط الغذائي Blood agar.. | 25 |
| 7 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Streptococcus viridans* على الوسط الغذائي Blood agar .. | 26 |
| 8 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Streptococcus pneumoniae* على الوسط الغذائي Blood agar ..... | 27 |
| 9 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Staphylococcus.spp* على الوسط الغذائي Blood agar .... | 29 |
| 10 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Staphylococcus cohnii* على الوسط الغذائي Blood agar ... | 30 |
| 11 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثاني ..... | 32 |
| 12 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Salmonella.spp* على الوسط الغذائي Nutrient agar ..... | 33 |
| 13 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* على الوسط الغذائي Blood agar ..... | 35 |
| 14 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Pseudomonas putida* على الوسط الغذائي Blood agar .... | 36 |
| 15 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثالث ..... | 38 |

| الشكل | الموضوع | الصفحة |
|---|---|---|


| | | |
|---|---|---|
| 16 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Staphylococcus epidermidis* على الوسط الغذائي Blood agar ..... | 39 |
| 17 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Klebsiella oxytoca* على الوسط الغذائي Blood agar ..... | 40 |
| 18 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Staphylococcus aureus* على الوسط الغذائي Blood agar .. | 42 |
| 19 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الرابع ..... | 44 |
| 20 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Proteus.spp* على الوسط الغذائي Blood agar ..... | 45 |
| 21 | الشكل العام لنمو البكتيريا *Shigella.spp* على الوسط الغذائي Nutrient agar ..... | 47 |
| 22 | الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الخامس ..... | 49 |

# 1 - المقدمـــة

# Introduction

يعتبر الغذاء أحد أهم احتياجات الإنسان الضرورية اللازمة لبقائه , فلا يستطيع الإنسان أن يعيش بصحة جيدة على نوع واحد من الغذاء ولابد أن يكون غذائه متوازن بحيث يمده بالطاقة اللازمة لنشاطه ( كربوهيدرات ودهون ) ويمده أيضا بالبروتينات والأحماض الأمينية الضرورية اللازمة لبناء جسمه وتعويض التالف من خلاياه بالإضافة لاحتواء الغذاء على الفيتامينات والعناصر المعدنية الضرورية لعمليات التمثيل الغذائي داخل جسمه ( خليل ، 2006 ) .

و مع التقدم الكبير والسريع الذي حدث في العلوم الحيوية والذي ارتبط بالغذاء .. فإن تلك المعلومات التي قدمت في ذلك الوقت لم تفد عن قيام كائنات حية مجهرية أطلق عليها( ميكروبات ) بإحداث الأمراض , وإن مثل هذه الميكروبات تكون لها القدرة على النمو في الغذاء . وباستمرار التقدم العلمي عرف المستهلك أن وجود هذه الميكروبات لا يكون دائما مصحوبا بإنتاج نكهة أو رائحة كريهة أو مظهر غير مرغوب فيه . وبناء على ذلك فإن بعض الأغذية تظهر من الناحية الطبيعية بصورة سليمة وصالحة للاستهلاك , ولكن يحدث و بعد ساعات قليلة من تناول مثل هذه الأغذية أن تظهر حالات مرضية بين أفراد الأسرة المستهلكة لهذه الأغذية ( نوفل ، 1989 ) .

حيث أصبح اليوم أمراً ضروريا بأن يقوم المستهلك بشراء ما يحتاجه من غذاء ومعظم هذا الغذاء غذاءً مصنعا من مصادر متعددة أو مختلفة . وبالتالي فقد بدأت تظهر مدى الحاجة إلى طريقة أو وسيلة تجعل هذا الغذاء المصنع أكثر سلامة وأمان لصحة المستهلك وكان ذلك مواكبا

لوقت بدأت تزداد فيه المعلومات في العلوم الطبيعية والكيميائية والحيوية التي تتعلق بالغـــذاء (الجندي ،1977) .

تعتبر جميع أنواع الأغذية بشكل عام من الركائز الأساسية في حمل واحتضان الكائنات الدقيقة والتي بدورها تتراكم أو تتجمع من خلال عمليات التخزين أو بعد التخزين . إن هذه التجمعات الميكروبية لا يمكن ملاحظتها أو الاستدلال عليها حيث تعتبر من الأجزاء الطبيعية للأغذية التي نتناولها في غذائنا ( Wilson , 2008 ).

أصبحت الدراسات الميكروبيولوجية للمنتجات الغذائية اختبارا على جودة عملية تصنيع الغذاء. و حدوث تلوث لهذا الغذاء خلال خطوات التصنيع أدت إلى الوصول إلى درجة الارتباط المباشر بين تحقيق كلٍ من النظافة التامة وإتباع الأساليب والخطوط الصحية والصحيحة في تصنيع الغذاء من جهة وبين درجة الجودة الميكروبية للمنتج الغذائي من جهة أخرى , ويعكس مثل هذا الارتباط المباشر جودة المنتج الغذائي وصحته وصلاحيته للاستهلاك البشري (البنـــا ،2001 ) .

ساهم التطور العلمي في مجال الرقابة الصحية على الأغذية بشكل كبير فـــي التقليـــل مـــن مخاطر الأغذية من خلال الاختبارات البيولوجية التي نتائجها قد تحمي المســـتهلك نظـــرا لغيـــاب المعلومات في كيفية تداول وتصنيع هذه الأغذية المطروحة في الأسواق والتي قد تحمل الجـــراثيم المسببة لأمراض التسمم أو تحمل السموم ( التوكسينات ) Toxins التي تسبب أيضاً أمراضاً للإنسان ( بنكوسون ورونسيفالي , 1985) .

أشارت الدراسات الحديثة إلى أن الكثير من الأمراض تنتج عن طريق استهلاك مواد غذائية ملوثة بميكروبات خطيرة Foodborn illnesses ، وكذلك فإن الكثير من الميكروبات تسبب الأمراض بواسطة انتاجها لسموم داخل هذه الأغذية Toxins ، كما إن هناك ميكروبات أخرى تسبب حساسية Allergy عند تناولها وآخرى تعتبر مسرطنة (Wilson , 2008 ) .

## 1.1 أمراض التسمم الغذائي Food poisoning diseases

يُعرف التسمم الغذائي عادة بأنه حالة مرضية مفاجئة تظهر أعراضها Symptoms خلال فترة زمنية قصيرة جداً على الشخص أو عدة أشخاص بعد تناولهم غذاء غير سليم صحياً . وتظهر أعراض التسمم الغذائي على هيئة غثيان وإسهال وتقلصات في المعدة والأمعاء . في بعض حالات التسمم الغذائي تظهر الأعراض على هيئة شلل في الجهاز العصبي بجانب بعض الاضطرابات المعوية Intestinal disturbances (Eley ,1996 ) . وتختلف أعراض الإصابة وشدتها والفترة الزمنية اللازمة لظهور الأعراض المرضية حسب مسببات التسمم وكمية الغذاء التي تناولها الإنسان (نوفل ، 1989) .

وتصيب البكتيريا الممرضة الإنسان بطريقتين مختلفتين ويطلق على أحدها التسمم الغذائي Food poisoning والآخرى العدوى الغذائية Food infection والفرق بين النوعين هو أن التسمم الغذائي يحدث عن طريق السم المفرز من البكتيريا داخل المادة الغذائية (Eley ,1996) ، بينما العدوى الغذائية تسببها البكتيريا الممرضة والمتواجدة داخل الغذاء عند تكاثرها في جسم الإنسان وبالإشارة إلى هذه الميكروبات الغذائية فإن الـ endotoxins تتواجد في البكتيريا السالبة

لصبغة جرام وهو جزء الـ Lipid A المتواجد في مـادة متعـدد السـكريات الـدهني Lipopoly saccharide والذي يعتبر جزء من جدار هذه البكتيريـا السـالبة لصـبغة جـرام ، ينمـا سـموم الـ Exotoxins أو السموم الخارجية هي بروتينات ذات ضراوة عالية Very virulent تنتجها بعض البكتيريا الموجبة لصبغة جرام الممرضة جدا داخل السيتوبلازم وتفرزها إلى خارج الخلية لتكسير الجزيئات الكبيرة ( Nicklin et al,2002 ) .

وتعتبر الأجهزة والمعدات المستخدمة في التصنيع من المصادر الرئيسية في تلوث الأغذية ، وقد تتلوث هذه الأجهزة والمعدات عن طريق مناولي الأغذية خلال عملية التطهيـر Disinfection والتعقيم Sterilization وكذلك وجود الحشرات قد يسبب في تلوث تلك الأجهـزة وأيضـا تعـرض المعدات والأجهزة إلى التلوث بمياه الصرف الصحي بأي صورة من الصور عن طريـق بعـض الأخطاء في خطوط الصرف ( Wilson,2008 ) .كذلك وجود الغشاء الحيوي Biofilm داخل أنابيب وخزانات وآلات التعبئة وهو عبارة عن غشاء دقيق جدا لا يرى بالعين المجردة يعمل على حمايـة الميكروبات من المواد المطهرة ، حيث يساهم هذا الغشـاء بشـكل كبيـر فـي تلـوث الأغذيـة ( Potter and Hotchkiss , 1995 ) .

تعتبر البيئة أحد المصادر الرئيسة في تلوث الأغذية المصنعة بمختلف أشكالها فـي حالـة إهمال أهمية البيئة المحيطة . و تتعلق سلامة عمليات تصنيع الغذاء بالعناصر البيئية المتمثلة فـي المياه المستخدمة في التصنيع والتنظيف والتعقيم حيث تلعب المياه دوراً أساسياً في صحة وسـلامة الأغذية وهي أساساً مهماً للغاية نظرا لما تحمله من ميكروبات ممرضة وخطيـرة علـى صـحة وسلامة الأغذية في حالة تلوثها . كذلك يلعب الهواء الداخلي دوراً مهما أيضاً كمصـدر لإنتقـال

الميكروبات الممرضة إلى الأغذية . ومن خصائص تلوث الهواء قدرته على نقل الجزيئات الدقيقة الحاملة للميكروبات Airborne إلى الأغذية (Fabian,1998).

تعتبر المثلوجات سلعة غذائية تستهلك بكثرة خصوصا في فصل الصيف ، و يمكن أن تكون مصدرا جيّدا للنمو الميكروبي بسبب التركيز الأيون الهيدروجيني pH المثالي وفترة التخزين الطويلة على الرغم من تحزينه في حالة مجمّدة ، حيث تحتوي المثلوجات المثالية على 12% من الدهن ، و 11% حليب خالي الدسم ، 15% سكر ، وحوالي 1% مكونات بسيطة وماء ، و مواد صلبة ، هذه المكونات الأساسية قد تساهم مع الكائنات الحية الدقيقة في التأثير على نوعية المنتج من ناحية محتواه الجرثومي أو احتوائه على أنواع معينة مختلفة من البكتيريا ( Brain and Allen , 1982 ) .

يعتمد حفظ الغذاء بالتجميد على إعاقة وتأخير النمو الميكروبي إلى الدرجة التي لا يحدث عندها تحلل تركيب الغذاء بفعل الميكروبات , فعلى مصنعي الأغذية الإدراك جيدا إن عملية التجميد ليست بالعملية المميتة والمهلكة للكائنات الدقيقة , ولا يمكن بالتالي توقع وجود تأثير معقم لهذه العملية ( نوفل , 1989 ) .

تدعم عملية تصنيع المثلوجات نمو البكتيريا المسبّبة للمرض والتي تتضمن الأنواع الآتية : ( *Salmonella species* , *Yersinia enterocolitica* , *E.coli* , *Staphylococcus aureus* , *Pseudomonas aeruginosa* , *Enterococcus faecalis* ) . إنّ نقطة بداية التحكم الرئيسيّة في معالجة المثلوجات هي كمية ما تتضمنه المادة الخام من المحتوى الميكروبي, لأن الحليب الخام قد يحتوي على البكتيريا المسبّبة للمرض والمنقولة بواسطة الأغذية، (Jay, 1986)

# 2- الدراسات السابقة

# Literature review

تعتبر المثلوجات من أكثر المسليات الغذائية عرضة للتلوث بالبكتيريا حيث تعتبر هذه المادة من الناحية الغذائية عاملا مهما في إمدادنـــا بالعناصر الغذائية المهمة . وغالبا ما يتعرض هذا المنتج إلى العديد من التأثيرات الناشئة من نشاط البكتيريا التي غالبا ماتسبب في فساد هذا المنتج . تسلك البكتيريا أو تجد طريقها إلى المثلوجات من خلال عدة طرق متباينة من أهمها السلامة الصحية الضعيفة إضافة إلى ضعف التعقيم وعدم الاهتمام بجودة المواد الداخلة في عملية تصنيع المنتج من ناحية خلوها من البكتيريا . تتعرض المثلوجات بوجه عام إلى العديد من البكتيريا المسببة للمرض Pathogens مسببة في فساد هذا المنتج و التقليل من قيمته الغذائية .

لقد أشار كلٍ من Akman و أخرون ( 2004 ) إلى انتشار أنواع من بكتيريا الليستريا *Listeria* في 28 عينة من عينات الأيس كريم التي تم جمعها من مخازن مدينة Kahramanmaras التركية و30 عينة من مدينة Adana حيث تم تحليل جميع العينات ميكروبيولوجيا بواسطة إدارة الأغذية والأدوية . هذه الأنواع شملت *L.grayi* ، *L.innocua* ، *L.welshimeri* ، *L.monocytogenes*

قام kuplulu و Sarimehmetoglu ( 2004 ) بدراسة ميدانية بتجميع حوالي 217 عينة من المثلوجات منها 80 عينة بنكهة الفانيليا و75 بنكهة الشكولاتة و62 بنكهة الفواكه وتم اختبارها ميكروبيولوجيا لتحديد مستوى تلوثها بأنواع البكتيريا البروسيللا *Brucella spp* . ومن خلال ذلك تم عزل وتعريف هذه البكتيريا وفقا لطريقة Farrell حيث تم تحديد مستوى التلوث بها بواسطة

تقنية ( **MPN** ) **Most Probable Number** إضافة إلى ذلك تم عزل 6.25% من البكتيريا *Brucella abortus* من عينات المثلوجات المحتوية على نكهة الفانيليا وكان مستوى ظهورها في هـــذه العينات MPN $10^2 \times 5.4$ ، بينما لم يتم عزل أي نوع من أنواع بكتيريا البروسيللا *Brucella spp* في عينات المثلوجات بنكهة الشكولاتة والفواكه على الإطلاق .

أجريا Sayed and Sayed ( 2003 ) دراسة لمعرفة مدى تواجد بعض الميكروبات الممرضة في عدد 100 عينه من عينات المثلوجات والتي تم جمعها بطريقه عشوائية من المحلات ومعارض الحلويات بمدينة أسيوط بجمهورية مصر العربية في الفترة من أبريل إلى أغسطس من سنة 2003 وقد أسفرت النتـــائج على تلــوث العينات ببكتيريا القـــولون *E coli O157:H* بنسبة 4% بواقع 6% و 2% من عينات المثلوجات المنتجة على المستوى الضيق والمصنعه على المستوى الواسع على التوالى. هذا بالإضافة إلى أنه قد تم عـــزل كلٍ مـــن البكتيريا *Yersinia enterocolitica* والبكتيـــريا *Yersinia pseudotuberculosis* من عينات المثلوجات المنتجة على المستوى الضيق بنسبة 16% و 10% على التوالى. وقد تم عزل البكتيريا *Y. enterocolitica* من عينات المثلوجات المصنعة على المستوى الواسع بنسبة 2%. وقد تـم التأكد من ضراوة سلالتيـــن من سلالات البكتيريا *Y. enterocolitica* بنسبة 22.2% بينما تبين أن نسبة 77,8% من سلالات *Y. enterocolitica* كانت غير ضارية وقد تم تصنيف عزلات من *Y. enterocolitica* إلى 4 و5 biotype بنسبة 66,7% و 33,3% على التوالي. و لم يتم التمكن من عزل بكتيريا السالمونيللا *Salmonella* من العينات . وقد تمت مناقشة الأهمية الصحية والوبائية للميكروبات المعزولة من هذه الدراسة . هذا بالإضافة إلى الإجراءات الصحية لرفع جودة المثلوجات من الناحية الجرثومية .

قام Elahi و آخرون ( 2002 ) بدراسة الجودة الصحية Sanitary quality لعينات المثلوجات التي تم تجميعها من محلات Milkvita و Igloo و Pollar و Savoy وتم اختبار العدد الكـــــلي للبكتيريا ( Total bacterial count ( TBC باستعمال Plate count agar وذلك من أجل الكشف عن القولونيات Coliforms ومكورة البكتيريا العنقودية Staphylococcus . تم عد الـــ Coliforms على الوسط الغذائي Violet red bile agar حيث تم تحضين هذا الوسط المزروع عند درجة 30م لمدة 24 ساعة . أما فيما يتعلق بمكورة البكتيريا العنقودية Staphylococcus تم عدها من خلال زراعتها على الوسط الغذائي Mannitol salt agar حيث تم تحضينه عند 37 م لمدة 24-48 ساعة . تم تسجيل العدد الكلي للبكتريا في عينات الأيس كريم في كلٍ من Milkvita و Igloo و Pollar و Savoy من 2800 إلى 3800 بمتوسط وحدة مكونة للمستعمرة Colony-forming unit (cfu) لكل مللتر . 3280 و 2800 إلى 4000 بمتوسط 3450 cfu\ml و 10.000 إلى 19.000 بمتوسط 15.000 cfu\ml و 26.800 إلى 56.000 بمتوسط 42.460 cfu\ml على التوالي . بينما عدد القولونيات Coliforms يتفاوت من 4 إلى 18 بمتوسط 11.60 cfu\ml و 18 إلى 42 بمتوسط 28 cfu\ml في Pollar وSavoy عـــــلى التوالي ولم توجد فـــــــي Milkvita و Igloo و عدد البكتيريا Staphylococcus يتفاوت من 2 إلى 7 بمتوسط 3.80cfu\ml و 7 إلى 17 بمتوسط 11.20cfu\ml في كلٍ من Igloo و Savoy ولم توجد في Milkvita و Pollar .

في دراسة أخرى قـــــــام بها كل من Barbini و Stefanini ( 2003 ) بعــزل البكتيريا *Y. enterocolitica* من المثلوجات عند قيم مختلفة من الرقم ( الأس ) الهيدروجيني وتخزينه عند درجة حرارة -18م . حيث وجدا من خلال هذه الدراسة البكتيـــــــريا *Y. enterocolitica* في

203 عينة منها 123 عينة صناعية industrial samples و 80 عينة منها غير صنـــاعية Non- industrial samples . تـــــــم عــزل سلالتين من البكتيريا *Y. enterocolitica* من العينات غير الصناعية . قد يكون التلوث عادة قبل عمليات التصنيع . تم تشخصين البكتيريا *Y. enterocolitica* بواسطة التحضين لعدد 9 عينات من المثلوجات الصناعية المحفوظة عند درجة حرارة -18م لمدة 480 يوم وكانت النتيجة تكوَن 20 مستعمرة في الملتر الواحد . حيث تم تصنيف العينات المزروعة إلى 3 مجموعات وفقا للرقم الهيدروجيني PH ( المجموعة الأولى PH =4-5 ، المجموعة الثانية PH=5-6 المجموعة الثالثة PH=6-7 ) . تم تحـــــــديد الحيوية Viability بواسطة اتحاد الطرح المباشر Combination of direct plating والإثراء Enrichment في المجموعة الأولى . البكتيريا *Y. enterocolitica* لم يتم عزلها إلا بعد 150 يوم من التخزين بينما في المجموعة الثانية والثالثة تم عزلها بعد 480 يوم .

قاما Windrantz و Arias ( 2000 ) بتقدير الجودة الميكروبية للمثلوجات فـــــي San jose و Costa rica وذلك من خلال تجميع 65 عينة من عينات المثلوجات التجارية والمصنعة في البيت فلاحظوا من خلال ذلك أن 37.1% من نسبة المثلوجات المصنعة في البيت و20 % من نسبة المثلوجات التجارية لا تحتوي على بكتيريا القولونيات Coliforms وكذلك نسبة 82.9% من المثلوجات المصنعة في البيت . و 56.7% من المثلوجات التجارية ملوثاً بواسطة بكتيريا القولونيات البرازية *Fecal coliforms* و51.4% من المثلوجات المصنعة في البيت . ونسبة 26.7% من المثلوجات التجارية ملوثاً ببكتيريا القولون *E.coli* . ومن خلال نتائج هذا البحث تم عزل أنواع بكتيريا الليستيريا *Listeria spp* ومنها البكتيريا *Listeria monocytogenes* والبكتيريا *Listeria innocua* . أما فيما يتعلق ببكتيريا السالمونيللا *Salmonella* التي تعتبر من

أكثر أنواع البكتيريا تلوثاً للغذاء لم يتم عزلها على الإطلاق من المثلوجات المُجهزة أو المصنعة في البيت .

قام Abrahao و أخرون ( 2008 ) بدراسة انتشار ونمو بكتيريا اللستيريا ذات النشوء الخلوي وحيد النواة *Listeria monocytogenes* في بعض من عينات المثلوجات البرازيلية وبعض أنواع الجبن الطري والشبه طري المصنع والمباع في ولاية Parana في البرازيل . تسعون عينة من عينات الجبن و 60 من عينات المثلوجات تم تحليلها جرثوميا وفقا للخطوط العريضة Guidelines الموضوعة بواسطة المنظمة الرسمية AOAC ومنظمة الغذاء و الدواء ( FDA ) Food and Drug Administration . في عينات المثلوجات لم يتم عزل أي نوع من *Listeria spp* بينما في 90 عينة من عينات الجبن كانت نسبة وجود الليستريا حوالي 12.20% منها 6.70% من بكتيريا *Listeria monocytogenes* و 5.50% منها بكتيريا *Listeria innocua* .

قام Uzunlu و آخرون ( 2004 ) بدراسة حول خاصية بقاء بعض أنواع من البكتيريا الممرضة Pathogenic bacteria , منـــــــها البكتيريا المكورة العنقودية الـــــذهبية *Staphylococcus aureus* وبكتيريا القولون *E.coli* ومكورة البكتيريا المعوية البرازية *Enterococcus faecalis* و بكتيريا السالمونيللا المعوية *Enteric Salmonella* وبكتيريا الزائفة الـــــزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* والبكتيريا المسببة للطاعون*Yersinia pestis* و المسببة لالتهاب القولون المعوي *Yersinia enterocolitica* في خليط المثلوجات بنكهة الفانيليا المبستر عند فترات تخزين مختلفة . ومن خلال النتائج أثبتوا بما لا يدع مجالا للشك في أن هذه البكتيريا وجدت بالفعل في العينات المجمدة خلال شهرين من فترة التخزين . تشير هذه النتائج إلى أهمية

الخطوات بعد الإنتاج في الحلويات ذات المحتوى اللبني المجمدة Post-production steps in frozen dairy desserts .

قام Ojokon سنة ( 2006 ) بدراسة حول الجودة الميكروبية Microbial quality للمثلوجات المتحصل عليها من الموردين في Akure في الباكستان . 10 أجناس من الميكروبات الطبيعية Microflora تم عزلها وأيضا تشخيصها وتعريفها . حيث تم تعريف 7 أنواع منها كبكتيريا و3 كفطريات أعفان Moulds . أوضح هذا البحث بأن البكتيريا كانت متواجدة في جميع العينات و هي البكتيريا العنقودية *Staphylococcus spp.* و بكتيريا الكليبسيللا *Klebsiella spp.* وبكتيريا القولون *Escherichia coli* و بكتيريا *Salmonella spp.* وبكتيريا *Bacillus spp.* وبكتيريا *Shigella spp.* وبكتيريا *Streptococcus spp.* حيث أشارت منظمة الصحة العالمية بأن هذه النسب التي أشرنا إليها تعتبر مؤشرا غير طبيعي لسلامة المثلوجات مما قد يسبب في إحداث أمراض للإنسان .

قام Kocak و آخرون ( 1998 ) بتجميع 46 عينة من المحلات في انقرة في تركيا وتم اختبارها من حيث الجودة الميكروبية , تمكنوا من عزل *Staphylococcus aureus* و *Fecal coliforms* بنسبة ( 4.3% ) و ( 15.2% ) من العينات التي تم تجميعها على التوالي .

قام Orallo و آخرون ( 1999 ) بدراسة ميدانية لثلاث مصانع كبيرة وثلاث مصانع صغيرة لتصنيع المثلوجات وتمكنوا من عزل *Staphylococcus aureus* و *Salmonella* من هذه المصانع التي تم منها تجميع العينات .

في هذه الدراسة قاما كلا من Vargun و Vatansever ( 2007 ) بعزل 160 عزلة من staphylococci من 40 عينة من الحليب و 52 عزلة من stahylococci من 30 عينة من المثلوجات . اثنان وعشرون عزلة من 160 و 9 من 52 عزلة كانت *Staphylococcus aureus* .

و من كل عينات الحليب وجدوا 4 عزلات فقط مقاومة للـــ Methicillin وواحدة فقط مقاومة للـــ Vancomycin , كذلك من كل عينات المثلوجات وجدوا 6 عزلات مقاومة للـــMethicillin وواحدة فقط أيضا مقاومة للـــ Vancomycin . وهذا يعني إن كل العينات التي تم تشخيصها هي مصدرللتسمم بالبكتيريا العنقودية الذهبية Staphylococcal food poisoning فهي إذا خطيرة على حياة الإنسان.

قاما Anuranjini و Dhanashree ( 2008 ) بدراسة ميدانية بتجميع 90 عينة من المثلوجات وتم إجراء تحليل بكتيري لها فتمكنوا من عزل 19 عزلة من *E.coli* و 4 عزلات من *Staphylococcus aureus* و عزلتين من *Enterococcus faecalis* ولم يتم عزل أي من *Salmonella spp* و *Shigella spp* من عينات المثلوجات التي تم تجميعها .

قام Yaman و آخرون ( 2006 ) بتقدير الجودة الميكروبية للمثلوجات التي تباع مباشرة من الآلات في الشوارع . فقد قاموا بتجميع 73 عينة فوجدوا إن فقط 4 % من العينات التي تم تجميعها جيدة من الناحية الصحية أما باقي العينات فكانت غير جيدة من الناحية الصحية و تمكنوا من عزل بكتيريا *E.coli* من 15 عينة من الـــ 73 التي تم تجميعها و من 9 عينات تم عزل منها *Yersinia spp.* و من 5 عينات تم عزل *Salmonella spp.* ومن 24 عينة تم عزل *Staphylococcus aureus* .

# 3- المواد وطرق العمل

# Materials & Methods

## 1.3 الطرق العامة General methods

### 1.1.3 تعقيم منطقة التطبيقات العملية Sterile working practic

يعتبر عامل التعقيم من العوامل الأساسية في إجراء التجارب التي تختص بدراسة الكائنات الدقيقة . في البداية تُعقم جميع الأوساط الغذائية والمواد من خلال استعمال المعقم البخاري الأوتوكلاف Autoclave ( China ) في ضغط 15 p.s.i لمدة 15 دقيقة ، ما لم تكون هناك مواد أو أجهزة حساسة لتأثير الحرارة الرطبة . تعقم الأطباق البلاستيكية والأدوات الأخرى الحساسة للحرارة بواسطة تركها لمدة 24 ساعة في 70% من الكحول ثم بعد ذلك تغسل جيداً بالماء المعقم .

تعقم أعناق وفوهات القنينات أو القوارير باللهب المباشر Direct flame قبل وبعد الاستعمال ثم بعد ذلك يعاد وضع أغطية هذه القنينات على جميع الحاويات بسرعة فائقة كلما أمكن ذلك وذلك لتحاشي أمكانية تلوثها . تُعقم الأطباق المزرعية Culture plates بعد صب الأوساط الغذائية السائلة وذلك من خلال إمرار اللهب المباشر على أسطح الأجار الذائب .

### 2.1.3 طريقة تجميع العينات Method of collecting samples

تُجمع العينات المراد الكشف عنها جرثوميا تحت ظروف خالية من الملوثات الميكروبية Aseptically أي بمعنى تُجمع في حاويات (China ) معقمة تعقيما كاملا في أماكن نظيفة جداً . تُجمع العينات من المراكز التجارية التي تسوق هذه المواد وذاك من خلال التجميع العشوائي . بعد عملية التجميع هذه تجرى التطبيقات الميكروبيولوجية بسرعة تامة عند الرجوع إلى المعمل وذلك للتأكد من صلاحيتها أو عدم صلاحياتها جرثومياً .

### 3.1.3 عملية الزرع Cultivation process

بعد تجميع العينات والذهاب بها للمعمل تم عمل التخفيفات المتتابعة للعينة Serial dilutions وتم الزرع على الوسط الغذائي Nutrient agar و كذلك على Blood agar و MacConkey agar في ظروف معقمة aseptically وبعدها وضعت الأطباق في الحاضنة incubator(Hamilton , Italy ) لمدة 24 ساعة.

### 4. 1.3 التحضين Incubation

تعتبر فترة حضانة الكائنات الدقيقة من أهم الخطوات الأساسية في التطبيقات المعملية الخاصة بالكائنات الدقيقة نظرا لما تلعبه هذه الخطوة من أهمية في عملية النمو . تم تحضين الأطباق ( Sterilin , U.K ) المزروعة في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة في الحاضنة .

### 5.1.3 عزل العزلات البكتيرية Isolation of bacteria

أولا يتم عزل وتنقية الكائن المراد التعرف عليه . يجب استعمال فقط المزارع الجرثومية النقية Axenic cultures أي المزارع ذات النوع الواحد من الكائنات والتي تم الحصول عليها بواسطة ماتحت الزرع Subculturing . تم عزل البكتيريا كمزارع نقية على الأوساط الاختيارية والتفريقية التي ذكرت سابقا. بعد فترة الحضانة وظهور المستعمرات النقية يتم صبغ المستعمرات وبصبغة جرام للتعرف على نوع البكتريا .

### 6.1.3 تعريف العزلات البكتيرية Identification of bacteria

يتم تعريف المستعمرة البكتيرية على حسب نوعها من حيث الصبغة موجبة او سالبة حيث إن البكتيريا الموجبة يتم اجراء اختبار الكتاليزعليها للتفريق بين *Staphylococcus. spp* و *Streptococcus.spp* وتم بعد ذلك إجراء بقية الإختبارات وهي: Novobiocin , polymyxin Coagulaseإذا كانت موجبة للكتاليز و يتم إجراء اختبار Optochin , Bacitracin إذا كانت سالبة للكتاليز أما بالنسبة للبكتيريا السالبة لصبغة الجرام فيتم إجراء الاختبارات الكيموحيوية مثل Oxidase , TSI , Indole , citrate للتفريق بين كل نوع . وكذلك قمنا بتعريف بعض الأنواع عن طريق جهاز الفونيكس Phoenix 1oo(Becton,Dickinson.USA) .

### 7.1.3 حفظ المزارع البكتيرية Preservation of bacterial cultures

حفظت المزارع البكتيرية في المبرد( Hitachi , Japan ) على هيئة أطباق مشمعة أو على هيئة أنابيب مائلة Slant cultures . بقيت هذه المزارع فترة من الوقت ( 15 يوم ) في ظروف بيئية باردة ( درج حرارة المبرد ) وذلك لمنع تكاثرها المفرط في وضع تخزيني Stock culture .

بعد فترة من الوقت وهي 15 يوم أجريت عملية نقل العزلات إلى وسط جديد وذلك مـــن أجـــل تنشيط الخلايا البكتيرية وزيادة حيويتها .

# 4 - النتائـــــج

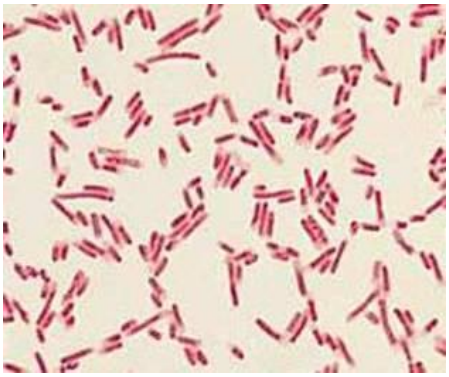
# Results

أظهرت نتائج الدراسة ( جدول 1 ) الذي يبين الموقع الأول وجود تنوع في أجناس البكتيريا المعزولة من عينات منتجات المثلوجات حيث كانت نسبة عزل بكتيريا القولون ( البكتيريا الغائطية ) *Escherichia coli* 10 عزلات ( شكل 1 ) و بكتيريا *Klebsiella.spp* 10 عزلات ( شكل 2 ) وكلاهما بنسبة 16.7% وهي أعلى نسبة مقارنة بنسب الأنواع الأخرى . و بكتيريا *Staphylococcus.spp* 7 عزلات ( شكل 9 ) بنسبة 11.7% . وبكتيريا *Streptococcus.spp* 5 عزلات ( شكل 6 ) وبكتيريا *Staphylococcus aureus* 5 عـــــزلات ( شكل 19 ) جمـــيعها بنسبة 8.3% . وبكتيـــــريا *Salmonella.spp* 4 عزلات ( شكل 12 ) بنسبة 6.0% . وبكتيريا الـــــزائفة الزنجارية *Pseudomonas aeruginosa* 3 عزلات ( شكل 13 ) وبكتيريا *Shigella.spp* 3 عزلات ( شكل 22 ) التي كانت جميعا بنسبة 5.0% . ويليها بكتيريا *Enterococcus faecalis* 2 عزلة ( شكل 3 ) وكذلك بكتيريا الليستريا *Listeria spp* 2 عزلة ( شكل 4 ) وبكتيريا *yersinia.spp* 2 ( شكل 21 ) عزلة وبكتيريا البـــــــروتيوس *Proteus.spp* 2 عزلة ( شكل 20 ) وبكتيـــــريا *Streptococcus pyogenes* 2 عزلة ( شكل 6 ) التي كانت جميعها بنسبة 3.3% .

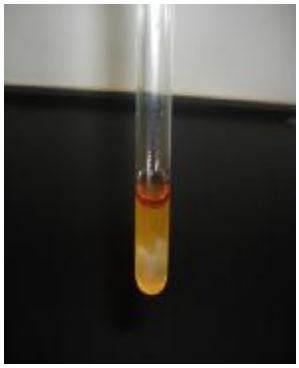
**جدول 1 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الأول**

| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | عدد العزولات | النسبة المئوية% |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | - | 10 | %16.7 |
| *Klebsiella spp.* | - | 10 | %16.7 |
| *Staphylococcus spp.* | + | 7 | %11.7 |
| *Streptococcus spp.* | + | 5 | %8.3 |
| *Staphylococcus aureus* | + | 5 | %8.3 |
| *Salmonella spp.* | - | 4 | %6.0 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | - | 3 | %5.0 |
| *Shigella spp.* | - | 3 | %5.0 |
| *Enterococcus faecalis* | + | 2 | %3.3 |
| *Listeria spp.* | + | 2 | %3.3 |
| *Yersinia spp.* | - | 2 | %3.3 |
| *Proteus spp.* | - | 2 | %3.3 |
| *Streptococcus pyogenes* | + | 2 | %3.3 |
| *Streptococcus viridans* | + | 1 | %1.7 |
| *Streptococcus pneumoniae* | + | 1 | %1.7 |
| *Staphylococcus epidermidis* | + | 1 | %1.7 |

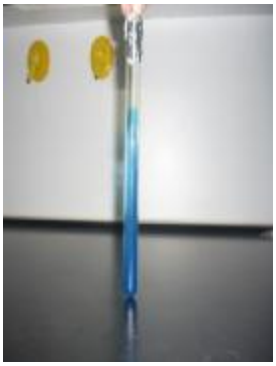
( أ )



( ب )



( ج )



( د )

( هـ )

**الشكل 1 : البكتيريا *Escherichia coli***

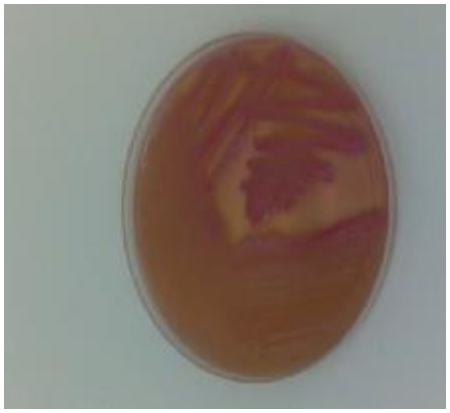
**أ- على الوسط الغذائي MacConkey agar .**

**ب- شكل البكتيريا تحت المجهر .**

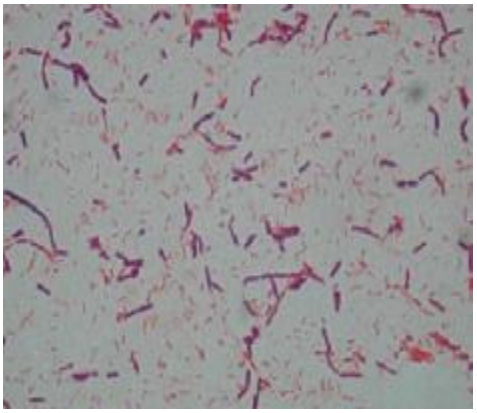
**ج- اختبار الأندول .**

**د- اختبار Citrate .**

**هـ- اختبار TSI .**



( أ )



( ب )

( ج )

( د )

( هـ )

**الشكل 2 : البكتيريا *Klebsiella spp.***

**أ- على الوسط الغذائي MacConkey agar**

**ب – تحت المجهر .**

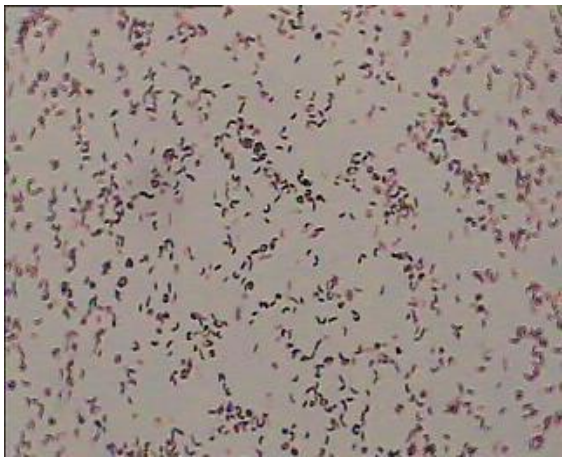
**ج- اختبار الأندول .**

**د – اختبار citrate .** **هـ - اختبار TSI .**

وبكتيريا *Streptococcus viridans* عزلة واحدة ( شكل 7 ) وبكتيريا *Streptococcus pneumoniae* عزلة واحدة ( شكل 8 ) وبكتيريا *Staphylococcus epidermidis* عزلة واحدة ( شكل 16 ) جميعها بنسبة 1.7% .

لقد أوضحت النتائج المتمثلة في الجدول 1 بأن هناك تشابها وثيقا بين كلٍ من البكتيريا *Escherichia coli* ( 10 عزلات ) والبكتيريا *Klebsiella.spp* ( 10 عزلات ) حيث أكدت هذه النتيجة بأن هذان النوعان من البكتيريا تعتبر من البكتيريا ذات العلاقة بعملية التلوث البكتيري Bacterial contamination في المثلوجات . حيث كانت هذه البكتيريا من أكثر الأنواع البكتيرية تلوثا للمثلوجات المعزولة من الموقع الأول . أما فيما يتعلق ببقية الأجناس البكتيرية الأخرى فكانت في الواقع متقاربة تقريبا من حيث عدد العزلات . إلا أن هناك تدني في عدد العزلات في البكتيريا *Streptococcus viridians* والبكتيريا *Streptococcus pneumoniae* والبكتيريا *Staphylococcus epidermidis* . هناك أيضاً تباينا بسيطا في عدد العزلات فيما بين بقية الأجناس البكتيرية الأخرى ( جدول 1 ) . إضافة إلى ذلك هناك أيضا تشابها كبيرا من حيث عدد العزلات البكتيرية خصوصا في الأجناس الآتية *Enterococcus faecalis* والبكتيريا *Listeria spp* والبكتيريا *Yersinia.spp* والبكتيريا *Proteus.spp* و *Streptococcus pyogenes* التي جميعها تمثل عزلة واحدة فقط .

( أ )



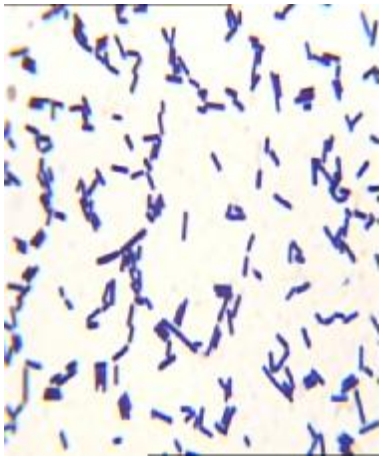
( ب )

**الشكل** 3 : **البكتيريا** ***Enterococcus faecalis***

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب – تحت المجهر .**

( أ )



( ب )

( ج )

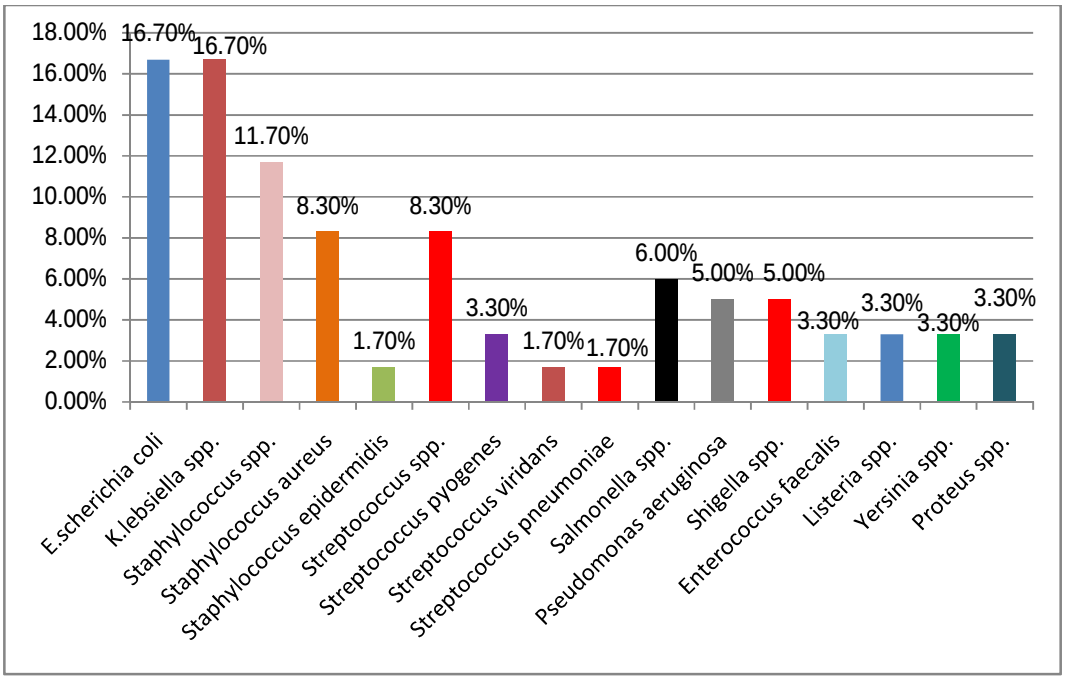
( د )

**الشكل 4 : البكتيريا *Listeria spp.***

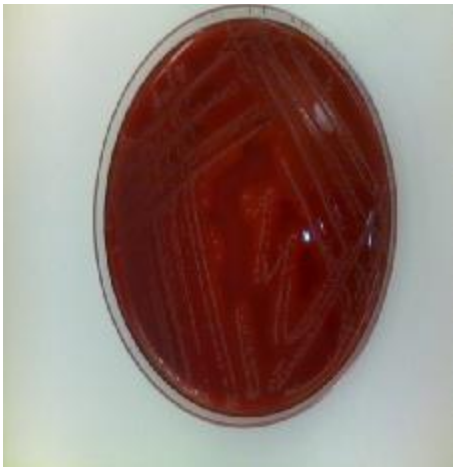
**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب- تحت المجهر .**

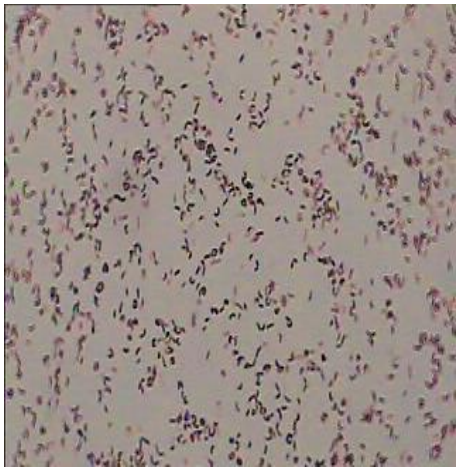
**ج- اختبار الحركة .** **د- اختبار Catalase موجب .**



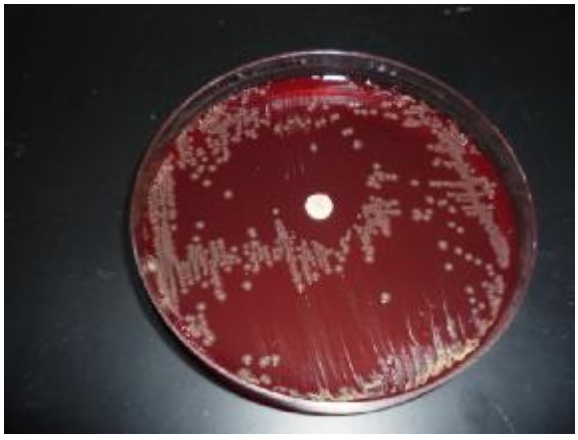

**الشكل 5 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الأول .**



( أ )



( ب )



( ج )

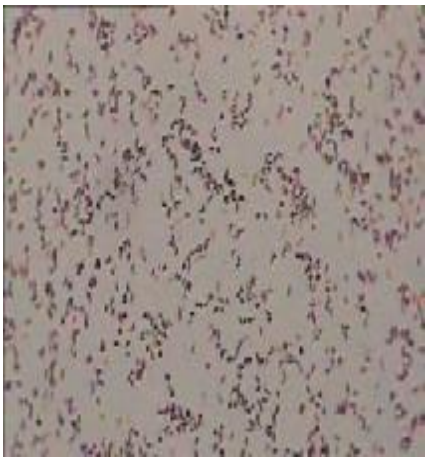
**الشكل 6 : بكتيريا *Streptococcus pyogenes***

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب – شكل البكتيريا تحت المجهر .**

**ج– تأثير Bacitracin على البكتيريا.**

( أ )



( ب )

( ج )

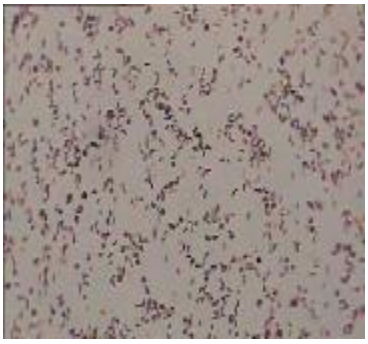
**الشكل 7 : بكتيريا *Streptococcus viridans***

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

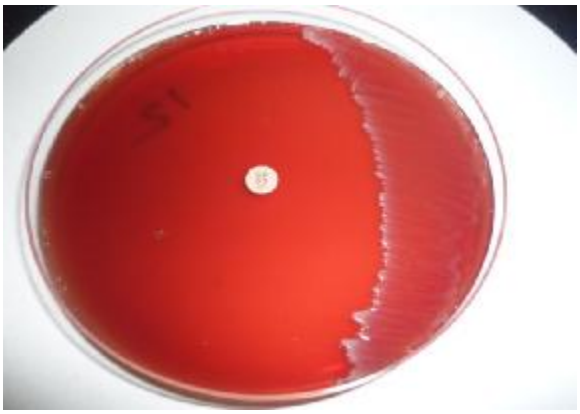
**ب – تحت المجهر**

**ج – تأثير Optochin على البكتيريا .**

( أ )



( ب )



( ج )

**الشكل 8 : بكتيريا *Streptococcus pneumoniae***

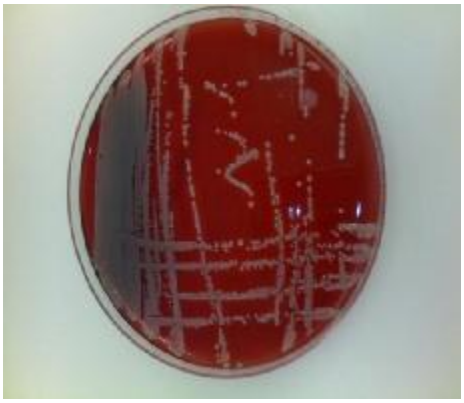
**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب – تحت المجهر .**

**ج – تأثير Optochin على البكتيريا .**

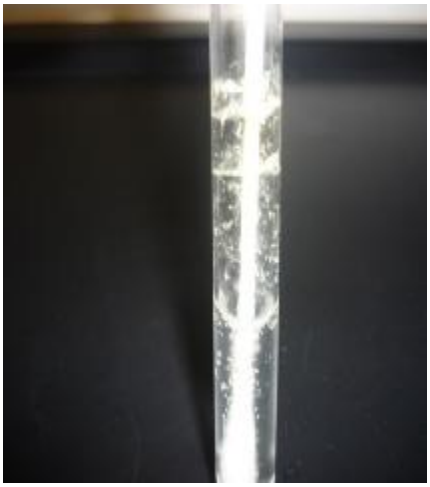
أظهرت نتائج الدراسة في ( الجدول 2 ) أيضا أن هناك تنوعا قليلاً في عدد العزلات البكتيرية المعزولة من الموقع الثاني حيث كانت نسبة عزل بكتيريا القولون ( البكتيريا الغائطية ) *Escherichia coli* 10 عزلات ( شكل 1 ) بنسبة 25.0% وبكتيريا *klebsiella.spp* 10 عزلات ( شكل 2 ) بنسبة 25.0% وبكتيريا *Streptococcus.spp* 7 عزلات بنسبة 17.5% ويليها *Staphylococcus cohnii* 5عزلات ( شكل 10 ) بنسبة 12.5% . وبكتيريا *Staphylococcus.spp* 4 عزلات وبكتيريا *Salmonella.spp* 4 عزلات كلاهما بنسبة 10.0% .

لقد كانت النتائج المدونة في ( الجـــدول 2 ) خصوصا فيما بين البكتيريا *Escherichia coli* ( 10 عزلات ) والبكتيريا*Klebsiella.spp* ( 10 عزلات ) متقاربة من حيث عدد العزلات وكذلك نسبتهما المئوية . حيث أوضحت هذه النتائج تشابها وثيقا مع نتائج الموقع الأول ( الجدول 1 ) (*Escherichia coli* و *Klebsiella.spp* ) . أما فيما يتعلق أيضا ببقية العزلات الأخرى فكانت في الواقع متقاربة إلى حدٍ ما بنسب بسيطة وهذا دليل على هناك وضعا بيئيا مناسبا لنمو هذه الأجناس البكتيرية . لقد بينت النتائج أيضاً بأن مكورة البكتيريا السبحية *Streptococcus.spp* ( 7 عزلات ) كانت متواجدة بنسبة حوالي 17.5 % وهي في الواقع نسبة عالية مقارنة بالبقية الأخرى .



( أ )

( ب )



( ج )

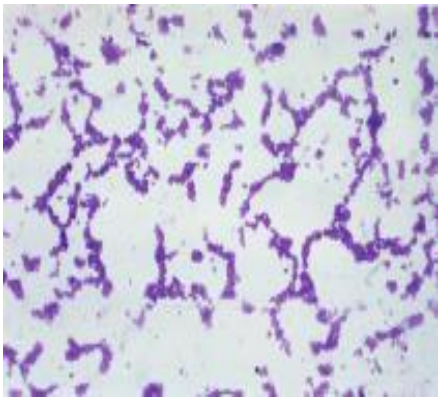
**الشكل 9 : بكتيريا *Staphylococcus spp.***

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب – تحت المجهر .**

**ج – اختبار Catalase موجب .**

( أ )



( ب )

( ج )

**الشكل 10 : بكتيريا *Staphylococcus cohnii***

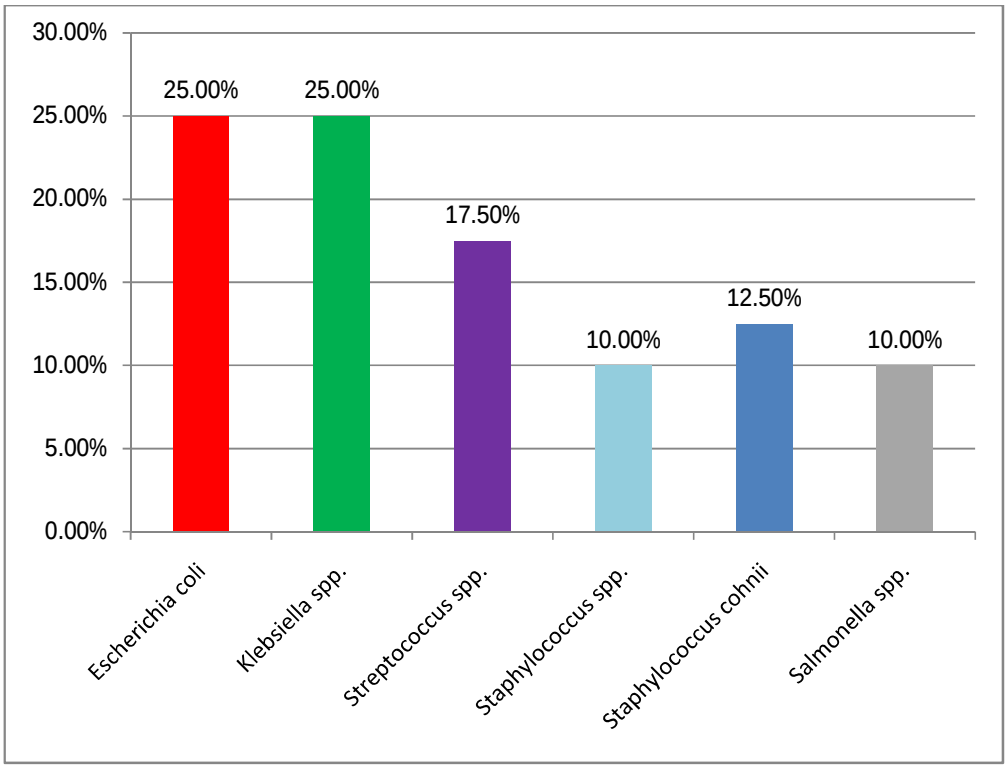
**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب – تحت المجهر .**

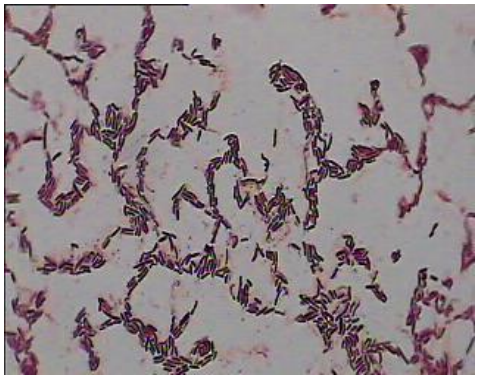
**ج – اختبار Catalase موجب .**

**جدول 2 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثاني .**

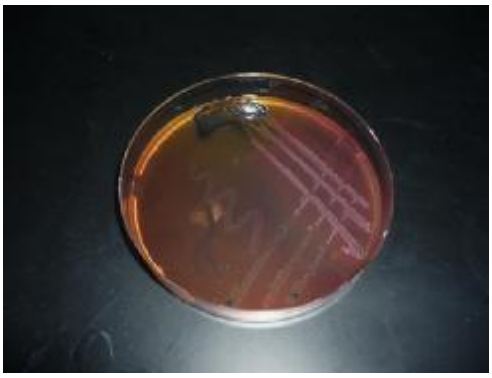
| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | العزولات | النسبة المئوية% |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | - | 10 | %25.0 |
| *Klebsiella spp.* | - | 10 | %25.0 |
| *Streptococcus spp.* | + | 7 | %17.5 |
| *Staphylococcus cohnii* | + | 5 | %12.5 |
| *Staphylococcus spp.* | + | 4 | %10.0 |
| *Salmonella spp.* | - | 4 | %10.0 |



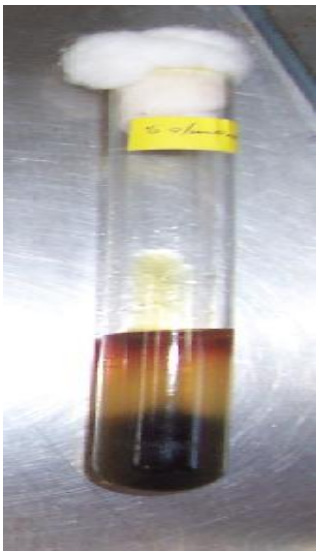

**الشكل 11 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثاني .**



( ب )



( أ )



( ج )

**الشكل 12 : بكتيريا *Salmonella spp.***

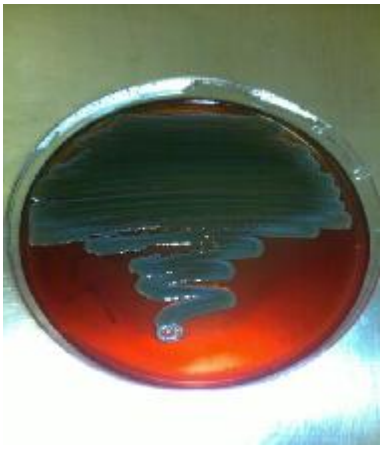
**أ- على الوسط الغذائي Nutrient agar .**

**ب- تحت المجهر .**

**ج- اختبار TSI .**

كذلك أظهرت نتائج الدراسة في الجدول 3 بأن هناك تنوعا واضحا في الأجناس البكتيرية المعزولة حيث سجلت بكتيريا *Escherichia coli* أعلى نسبة فكانت 10 عزلات بنسبة 20.8% ثم تليها بكتيريا *yersinia spp.* 9 عزلات بنسبة 18.7% وبكتيريا *Klebsiella spp.* 8 عزلات بنسبة 16.6% . وبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 7 عزلات ( شكل 13 ) بنسبة 14.5% وبكتيريا *Streptococcus spp.* 5 عزلات بنسبة 10.4% وبكتيريا *Staphylococcus aureus* 2 عزلة وبكتيريا *Pseudomonas putida* 2 عزلة ( شكل 14 ) وبكتيريا *Salmonella spp.* 2 عزلة وبكتيريا *Klebsiella oxytoca* 2 عزلة ( شكل 17 ) جميعها بنسبة 4.1% وبكتيريا *Staphylococcus epidermidis* عزلة واحدة بنسبة 2.08% .

لقد بينت النتائج المدونة في الجدول 3 بأن هناك تشابه وثيق في عدد العزلات ونسبتها خصوصا فيما يتعلق بالأجناس البكتيرية التالية : *Escherichia coli* والبكتيريا *yersinia.spp* والبكتيريا *Klebsiella spp.* والبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* . أما فيما يخص بقية الأجناس البكتيرية الأخرى فإنه يوجد تشابه كبير في عدد العزلات وكذلك نسبتها المئوية . إلا أن هناك تدني في عدد العزلات ونسبتها خصوصا في البكتيريا *Staphylococcus epidermidis* .



( أ )

( ب )

( ج )

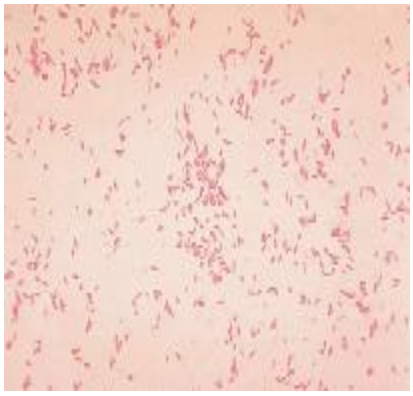
**الشكل 13 : بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa***

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب - شكل البكتيريا تحت المجهر**

**ج - اختبار Oxidase .**

( أ )



( ب )

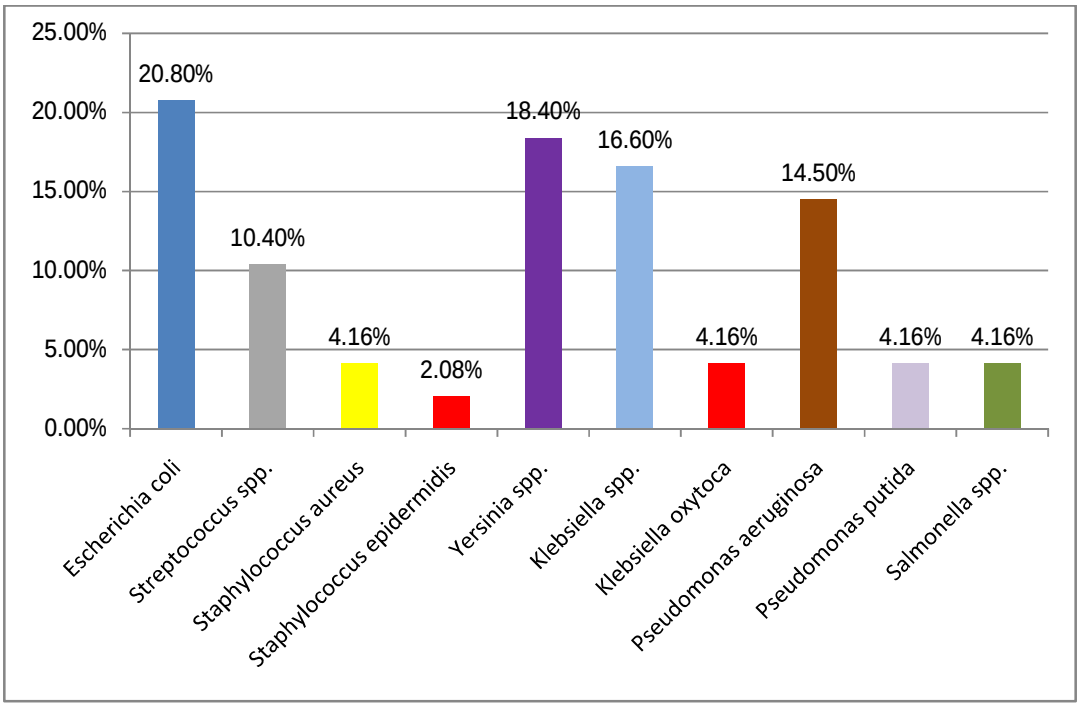
**الشكل** 14 : **بكتيريا** ***Pseudomonas putida***

أ- **على الوسط الغذائي Blood agar .**

**ب- شكل البكتيريا تحت المجهر .**

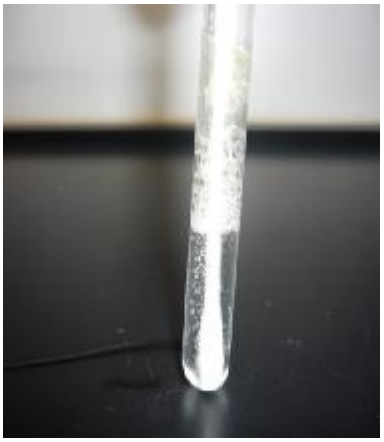
**جدول 3 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثالث .**

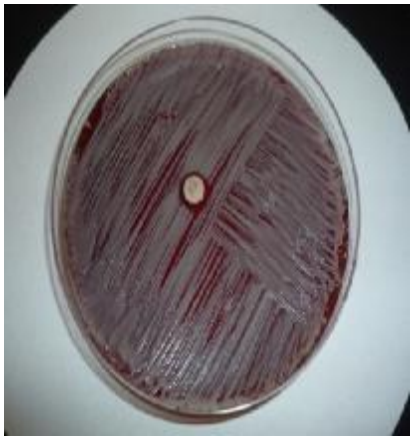
| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | عدد العزلات | النسبة المئوية% |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | - | 10 | %20.8 |
| *Yersinia spp.* | - | 9 | %18.4 |
| *Klebsiella spp.* | - | 8 | %16.6 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | - | 7 | %14.5 |
| *Streptococcus spp.* | + | 5 | %10.4 |
| *Staphylococcus aureus* | + | 2 | %4.16 |
| *Pseudomonas putida* | - | 2 | %4.16 |
| *Salmonella spp.* | - | 2 | %4.16 |
| *Klebsiella oxytoca* | - | 2 | %4.16 |
| *Staphylococcus epidermidis* | + | 1 | %2.08 |




**الشكل 15 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الثالث .**

( أ )          ( ب )









( ج )          ( د )

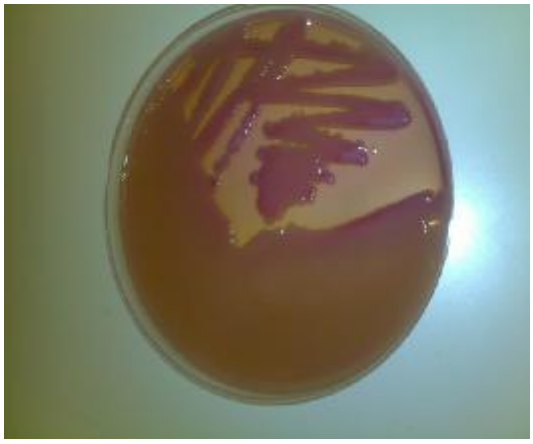
الشكل 16 : بكتيريا *Staphylococcus epidermidis*

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

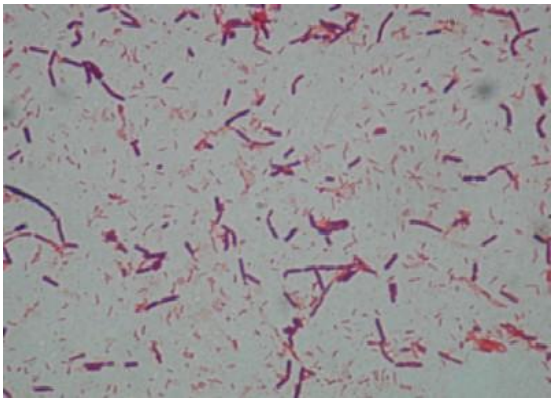
**ب- تحت المجهر .**

**ج - اختبار Catalase موجب .**

**د - تأثير Polymyxin .**



( أ )



( ب )

**الشكل** 17 : **بكتيريا** ***Klebsiella oxytoca***

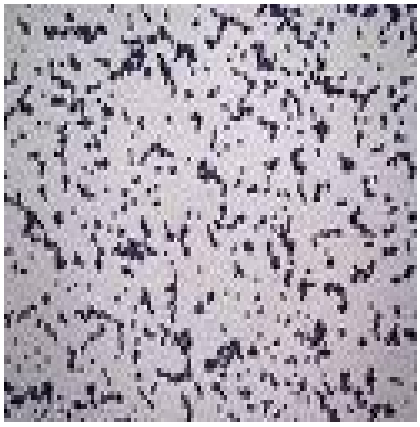
**أ- على الوسط الغذائي MacConkey agar .**

**ب- تحت المجهر .**

إضافـــة إلى ذلك أظهرت نتائج الدراسة في الجدول 4 بأن هناك تنوعا واضحا في الأجناس البكتيرية المعزولة حيث سجلت بكتيريا *Escherichia coli* أعلى نسبة فكانت 10 عزلات ( شكل 1 ) بنسبة 22.2% ثم تليها بكتيريا *Staphylococcus.spp* 7 عزلات ( شكل 9 ) وبكتيريا *Salmonella.spp* 7 عزلات كلاهما بنسبة 15.6% . وبكتيريا *Streptococcus.spp* 5 عزلات وبكتيريا *Yersinia.spp* 5 عزلات كلاهما بنسبة 11.1% . وبكتيريا *Staphylococcus aureus* 4 عزلات بنسبة 8.9% . وبكتيريا *Klebsiella.spp* 3 عزلات بنسبة 6.7% . وبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 2 عزلة وبكتيريا *Proteus.spp* 2 عزلة ( شكل 21 ) كلاهما بنسبة 4.4% .

لقد بينت النتائج أيضا بأن هناك تشابه كبير فيما يتعلق بالبكتيريا العنقودية *Staphylococcus.spp* والبكتيريا *Salmonella.spp* في عدد العزلات وكذلك النسبة المئوية وكذلك بين مكورة البكتيريا السبحية *Streptococcus.spp* والبكتيريا *Yersinia.spp* التي تبين تشابها فيما بينها من حيث عدد العزلات والنسبة المئوية وكذلك أيضا فيما بين البكتيريا *Proteus.spp* و *Pseudomonas aeruginosa* التي توضح أيضا التشابه في عدد العزلات وأيضا في النسبة المئوية . أما فيما يتعلق بالبكتيريا العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* فكانت عدد العزلات والنسبة المئوية مقارنة ببقية العزلات البكتيرية الأخرى أي متوسطة Moderate .

( أ )



( ب )

( ج )

( د )

**الشكل 18 : بكتيريا *Staphylococcus aureus***

**أ- على الوسط الغذائي Blood agar .**

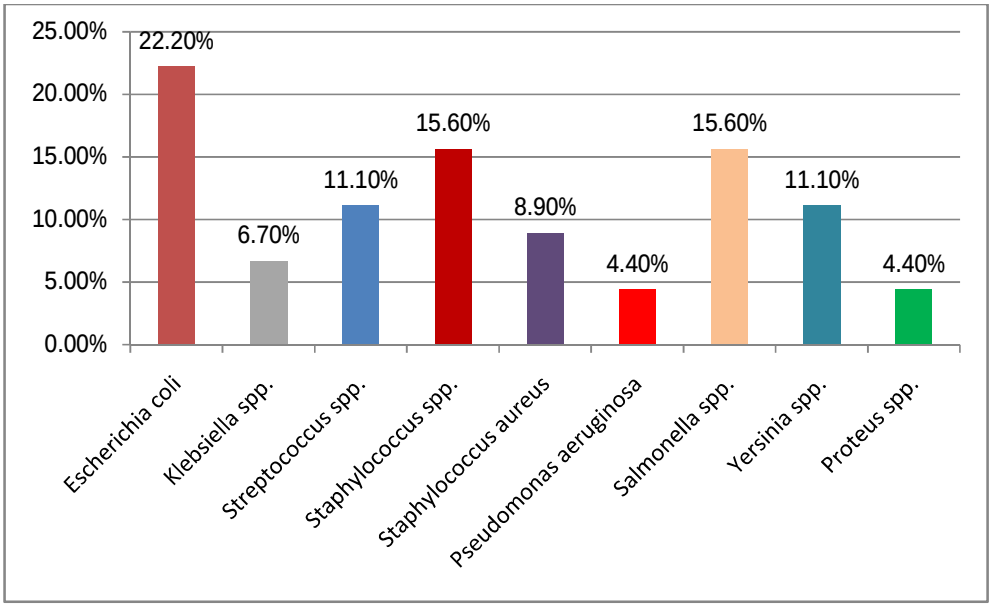
**ب- تحت المجهر .**

**ج - اختبار Coagulase موجب .**

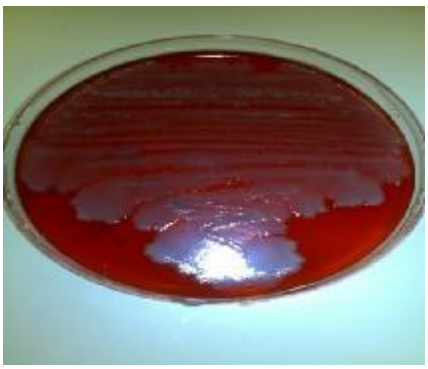
**د- نمو البكتيريا على Mannitol.**

**جدول 4 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الرابع .**

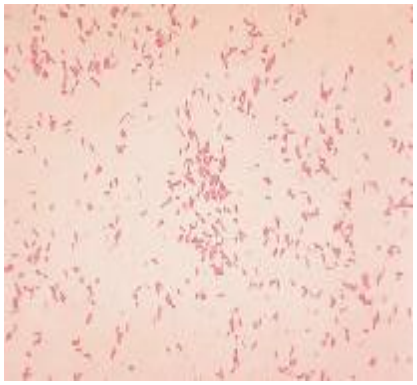
| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | عدد العزلات | النسبة المئوية% |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | - | 10 | %22.2 |
| *Staphylococcus spp.* | + | 7 | %15.6 |
| *Salmonella spp.* | - | 7 | %15.6 |
| *Streptococcus spp.* | + | 5 | %11.1 |
| *Yersinia spp.* | - | 5 | %11.1 |
| *Staphylococcus aureus* | + | 4 | %8.9 |
| *Klebsiella spp.* | - | 3 | %6.7 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | - | 2 | %4.4 |
| *Proteus spp.* | - | 2 | %4.4 |




**الشكل 19 : توزيع الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الرابع**



( أ )



( ب )

( ج )

**الشكل** 20 : **بكتيريا** ***Proteus spp.***

أ- **على الوسط الغذائي** **Blood agar**.

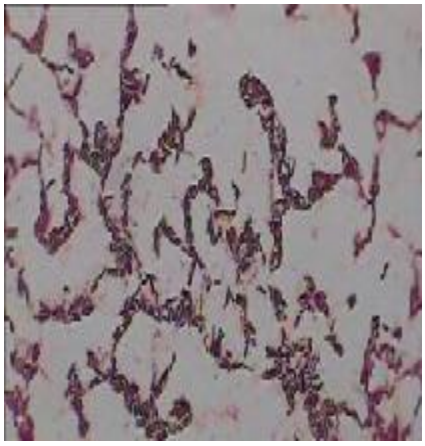
**ب- تحت المجهر .**

**ج- اختبار TSI .**

أظهرت نتائج الدراسة في الجدول 5 أن هناك تنوعا في الأجناس البكتيرية المعزولة حيث سجلت بكتيريا *Escherichia coli* أعلى نسبة فكانت 8 عزلات بنسبة 18.2% ثم تليها بكتيريا *Salmonella.spp* 6 عزلات ( شكل 12 ) بنسبة 13.6% . وبكتيريا *Streptococcus.spp* 5 عزلات وبكتيريا *Staphylococcus aureus* 5 عزلات وبكتيريا *Staphylococcus.spp* 5 عزلات وبكتيريا *Shigella.spp* 5 عزلات ( شكل 21 ) جميعها بنسبة 11.4% . وبكتيريا *klebsiella.spp* 4 عزلات بنسبة 9.1% . وبكتيريا *Proteus.spp* 3 عزلات بنسبة 6.8% . وبكتيريا *Klebsiella pneumoniae* 2 عزلة بنسبة 4.5% . وبكتيريا *Staphylococcus cohnii* عزلة واحدة بنسبة 2.3% .

لقد أشارت النتائج المتعلقة بعزل البكتيريا من عينات المثلوجات من الموقع الخامس ( جدول 5 ) . بأن أعلى عدد عزلات وترددها كانت من خلال البكتيريا *Escherichia coli* حيث أكدت هذه النتيجة بأن هذا الموقع يعتبر من المواقع ذات التلوث البكتيري حيث يعتبر أيضا هــذا النوع من البكتيريا مؤشرا إيجابيا Index في عملية التلوث . أما فيما يتعلق ببقية الأنواع البكتيرية الأخرى فكانت في الواقع متقاربة من حيث عدد العزلات ونسبها إلى حدٍ ما ماعدا البكتيريا *Staphylococcus cohnii* التي أوضحت في الواقع تدنيا كبيرا في عدد العزلات وتردد نسبتها .

( أ )



( ب )

( ج )

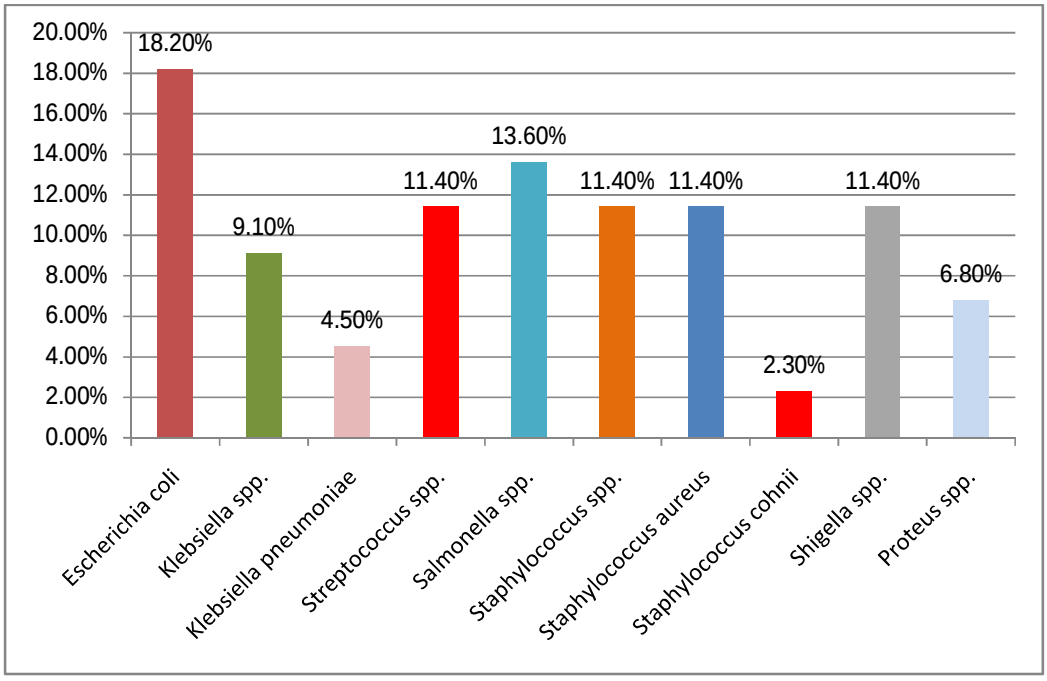
**الشكل 21 : بكتيريا *Shigella spp.***

**أ- على الوسط الغذائي Nutrient agar.**

**ب – تحت المجهر ج – اختبار TSI .**

**جدول 5 : الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الخامس .**

| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | عدد العزلات | النسبة المئوية % |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | - | 8 | %18.2 |
| *Salmonella spp.* | - | 6 | %13.6 |
| *Streptococcus spp.* | + | 5 | %11.4 |
| *Staphylococcus aureus* | + | 5 | %11.4 |
| *Staphylococcus spp.* | + | 5 | %11.4 |
| *Shigella spp.* | - | 5 | %11.4 |
| *Klebsiella spp.* | - | 4 | %9.1 |
| *Proteus spp.* | - | 3 | %6.8 |
| *Klebsiella pneumoniae* | - | 2 | %4.5 |
| *Staphylococcus cohnii* | + | 1 | %2.3 |




**الشكل 22 : توزيع الأنواع البكتيرية المعزولة من الموقع الخامس .**

أظهرت نتائج الدراسة في الجدول السادس بأن هناك تنوعا واضحا في طبيعة الأنواع البكتيرية المعزولة من جميع المواقع حيث إن بكتيريا القولون *Escherichia coli* سجلت أعلى نسبة حيث كانت 39 عزلة بنسبة 17.1% ثم تليها بكتيريا *Klebsiella spp.* 35 عزلة بنسبة 15.4% وبكتيريا *Streptococcus spp.* 27 عزلة بنسبة 11.8% وبكتيريا *Staphylococcus spp.* 23 عزلة وبكتيريا *Salmonella spp.* 23 عزلة و كلاهما بنسبة 10.08% وهي نسبة متوسطة مقارنة بباقي النسب وبكتيريا *Staphylococcus aureus* 16 عزلة وبكتيريا *Neisseria spp.* 16 عزلة كلاهما بنسبة 7.0% وبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* 12 عزلة بنسبة 5.3% وبكتيريا *Shigella spp.* 8 عزلات بنسبة 3.5% وبكتيريا *Proteus spp.* 7 عزلات بنسبة 3.1% . وبكتيريا *Staphylococcus cohnii* 6 عزلات بنسبة 2.6% وبكتيريا *Streptococcus pyogenes* 2 عزلة وبكتيريا *Enterococcus faecalis* 2 عزلة وبكتيريا *Staphylococcus epidermidis* 2 عزلة وبكتيريا *Listeria spp.* 2 عزلة وبكتيريا *Pseudomonas putida* 2 عزلة وبكتيريا *Klebsiella oxytoca* 2 عزلة جميعها بنسبة 0.9% وتعتبر نسبتها قليلة . وبكتيريا *Streptococcus viridans* عزلة واحدة وبكتيريا *Streptococcus pneumoniae* عزلة واحدة كلاهما بنسبة 0.4% وهي أقل نسبة مقارنة بباقي النسب .

لقد بينت النتائج بأن هناك ارتباطا كبيرا فيما بين بعض الأنواع البكتيرية من حيث عدد العزلات وأيضا نسبها مثل البكتيريا *Escherichia coli* والبكتيريا *Klebsiella spp.* والبكتيريا *Streptococcus spp.* والبكتيريا *Staphylococcus spp.* والبكتيريا *Salmonella spp.* . إلا أن هناك تشابه أيضا بين كلٍ من البكتيريا *Staphylococcus aureus* والبكتيريا *Yersinia spp.* والبكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* إلى حدٍ ما من حيث عدد العزولات ونسبها . وهناك أيضا تشابها فيما

بين البكتيريا *Shigella spp.* والبكتيريا *Proteus spp.* والبكتيريا *Staphylococcus cohnii* من حيث عدد العزلات ونسبها . أما فيما يتعلق ببقية الأنواع البكتيرية الأخرى فكانت في الواقع متشابهة في جميع خصائصها من حيث عدد العزلات ونسبها .

**جدول 6 : الأنواع البكتيرية المعزولة من جميع المواقع .**

| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | العزلات | النسبة المئوية |
|---|---|---|---|
| *Escherichia coli* | - | 39 | %17.5 |
| *Klebsiella spp.* | - | 35 | %15.4 |
| *Streptococcus spp.* | + | 27 | %11.8 |
| *Staphylococcus spp.* | + | 23 | %10.08 |
| *Salmonella spp.* | - | 23 | %10.08 |
| *Staphylococcus aureus* | + | 16 | %7.0 |
| *Yersinia spp.* | - | 16 | %7.0 |
| *Pseudomonas aeruginosa* | - | 12 | %5.3 |
| *Shigella spp.* | - | 8 | %3.5 |
| *Proteus spp.* | - | 7 | %3.1 |

**جدول 6 : ( تابع ) الأنواع البكتيرية المعزولة من جميع المواقع**

| الأجناس البكتيرية المعزولة | صبغة الجرام | العزلات | النسبة المئوية |
|---|---|---|---|
| *Staphylococcus cohnii* | + | 6 | %2.6 |
| *Streptococcus pyogenes* | + | 2 | %0.9 |
| *Enterococcus faecalis* | + | 2 | %0.9 |
| *Staphylococcus epidermidis* | + | 2 | %0.9 |
| *Listeria spp.* | + | 2 | %0.9 |
| *Pseudomonas putida* | - | 2 | %0.9 |
| *Klebsiella oxytoca* | - | 2 | %0.9 |
| *Streptococcus viridans* | + | 1 | %0.4 |
| *Streptococcus pneumoniae* | + | 1 | %0.4 |

# 5- المناقشة

# Discussion

تعتبر المثلوجات Ice cream من أكثر المسليات الغذائية تعرضا للتلوث الميكروبي . ونظرا لأهمية هذا المنتج Product في الحياة العامـــة خصوصا في فصل الصيف ، فإن العديد من الأفراد يتهافتون على استهلاك هذا المنتج . وتتكون المثلوجات عموما من مخلوط يتألف من حليب وعوامل محلية ومثبتة Sweetening and stabilizing agents إضافة إلى مواد تعطي للمثلوجات النكهة المفضلة وكذلك اللون المناسب ( Graff , 1974 ) . ويعتبر محتوى البروتين والفيتامين في المثلوجات قليلا جدا مقارنة مع المحتويات الأخرى . ونظرا إلى أهمية هذه المحتويات الحيوية ، فإن العديد من الأنواع البكتيرية Bacterial species تنجذب نحوها نظرا لما تحتويه هذه المنتجات من مواد ذات طابع غذائي مهم لها حتى تستمر في أداء وظائفها الحيوية مؤدية في حقيقة الأمر إلى إصابة مستعملي المثلوجات من خلال ما يعرف بالتلوث البكتيري Bacterial contamination .

ومن خلال النتائج المتحصل عليها في هذا السياق ، فإن هناك تشابها كبيرا في عدد العزلات البكتيرية المعزولة ونسبتها ، خصوصا فيما يتعلق بتردد بكتيريا القولون *Escherichia coli* وأنواع البكتيريا *Klebsiella spp.* وهي تشكل في الواقع أعلى تواجدا وكذلك أعلى نسبه في جميع المواقع التي أجريت عليها الدراسة . لقد بينت النتائج بأن هذان النوعان من البكتيريا يلعبان دورا مهما في عملية تلوث المثلوجات . حيث تعتبر هـــــــذه الأنواع من البكتيريا ( *Escherichia coli* والبكتيريا *Klebsiella spp.* ) من أهم العوامل البيولوجية في إحداث التلوث البكتيري للمثلوجات .

لقد كانت النتائج في جميع مواقع العزل تمثل أعلى نسبه لهذه الأنواع البكتيرية سالفة الذكر . وكذلك كانت عملية التصنيع بدائية في الواقع نظرا لعدم توفر الأجهزة المعقمة وكذلك غياب السلامة الصحية والتعقيم مما أدي إلى زيادة نسبة التلوث الميكروبي في المنتج المصنع الذي بدوره يصل إلى المستهلك في حالة ملوثة .

وكما هو معروف فإن الملوثات البكتيرية تلعب دورا كبيرا في عملية التلوث التي تتعرض إليها المثلوجات ونظرا لافتقار السلامة الصحية للحفاظ على هذه المادة ، فإن المثلوجات تتعرض إلى التلوث البكتيري الناشئ عن الظروف البيئية المحيطة وكذلك طريقة التعامل الغير صحية . لقد أشارت هذه النتائج التي تم الحصول عليها ، بأن هناك تشابها كبيرا بين السلالات البكتيرية المعزولة من معظم المصانع . حيث تشير هذه النتيجة إلى إن هناك علاقة وطيدة بين الحالات البيئية لجميع المصانع إضافة إلى الافتقار إلى السلامة الصحية .

إن الاهتمام بعملية التعقيم يسهم في التقليل من نسب التلوث ، و من خلال هذه الدراسة فقد لوحظ إن هناك قصور كبير في العناية الصحية للعاملين ، ولقد أوضحت الدراسة بأن أكثر الكائنات الدقيقة المسببة للتلوث تكمن في الملوثات البكتيرية Bacterial contaminants وهي في الواقع تعتبر من أخطر الكائنات الدقيقة على صحة الإنسان حيث تم عزل العديد من هذه البكتيريا مثل بكتيريا القولون *Escherichia coli* من جميع المصانع حيث تعتبر هذه البكتيريا من أكثر الأنواع المسببة للتلوث ( Indicator ) في جميع المصانع المستهدفة حيث كانت نسبة عزلها 17.5% وهذا ما أشار إليه في السابق Sayed و Sayed (2003) ،Windrantz و Arias (2000) , Uzunl وآخرون (2004), Yaman وآخرون (2006) و Anuranjini و Dhanashree (2008).

وطبيعة هــذه البكتيريا تعتبر ممرضة و وجودها في الأغذية يعتبر مؤشرا إيجابيا لتلوث المنتجات الغذائية نظرا للعلاقة الوطيدة بين هذه الجراثيم والمياه التي تلعب دورا أساسيا في عملية التصنيع . وبشكل عام فإن هذه السلالات البكتيرية المعزولة ذات علاقة كبيرة بمستوى التلوث الميكروبي Microbial contamination نظرا لافتقار احتياطات السلامة ومستوى السلامة الصحية في المصانع وللأفراد العاملين على حد سواء ( Wagner , 2006 ).

جاءت بكتيريا *Klebsiella spp.* في المرتبة الثانية حيث تم عزلها بنسبة 15.4% وهذا ما أكده Ojokon ( 2006 ) و Anuranjini و آخرون (2008) . وتعتبر أيضاً جزاً مهما من الفلورا الطبيعية Microflora للإنسان والحيوان على حدٍ سواء حيث تستوطن الأمعاء الغليظة للإنسان وبالتحديد في منطقة القــولون . وتعتبر أيضاً من العوامل المسببة للعدوى في المستشفيات والمصانع . وعلى الرغم من أن هذه البكتيريا تعتبر من الكائنات الطبيعية التي تعيش في الإنسان ، إلا أنها تعتبر عاملا ممرضا في حالة انتقالها من مكان لأخر مثل الغذاء الذي يتناوله الإنسان فهي تفرز مادة سمية لا تتأثر بالحرارة heat-stable. كما تــم عزل سلالتين منها وهمـــــا الأكثر شيوعا *Klebsiella Pneumoniae* و *Klebsiella oxytoca* ويسبب النوع الأول التهابات حادة في الجهاز التنفسي وتتميز هذه التهابات بأنها تحدث بشكل سريع وتترك تلف كبير في أنسجة الرئة ومعدل الوفاة بها عـــــــالي يصل إلى حوالي 30%-40% .

ومن الأعراض التي تظهر على المصابين بهذا النوع من الجراثيم ارتفاع درجة الحرارة ، قشعريرة ، نزيف و سعال . وهناك التهابات أخرى تسببها هذه البكتيريا للإنسان وهي التهاب القصبة الهوائية والتهاب المسالك البولية وتجرثم الدم Bacteremia والتهاب السحايا والتهاب المرارة.

لقد تم عزل أنواع من مكورة البكتيريا السبحية *Streptococcus spp.* بنسبة كبيرة من العينات التي تـــــم تجميعها وهذا يتفق مع Uzunl وآخرون (2002) و Ojokon ( 2006 ) و Anuranjini و آخرون (2008) حيث يعود جنس الـــ *Streptococcus* إلي العائلة السبحية *Streptococcaceae* يرتبط وجود بعض أنواع هذه البكتيريا بالجزء العلوي من الجهاز التنفسي في الإنسان والحيوان . حيث تسبب هذه البكتيريا بعض الأمراض كالحمى القرمزية والتهاب اللوزتين والبعض الأخر يوجد في الجهاز الهضمي وينتشر بصورة واسعة في النباتات ومنتجات الألبان وبعض أنواعها تسبب في ظهور أعراض التسمم الغذائي عند الإنسان و وجود بعض أنواعها في الأغذية بأعداد كبيرة دليل على تلوث الأغذية بالمواد البرازية الناتجة من التلوث وكذلك بعض الأنواع قد تنتقل من العمال .

ويتبع جنس مكورة البكتيريا العنقودية *Staphylococcus spp.* عائلة بكتيريا Micrococceae وهي بكتيريا كروية الشكل موجبة لصبغة جرام وموجبة لاختبار الكتاليز , معظم سلالات البكتيريا العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* تنتج صبغة ذهبية اللون ، و تخثر بلازما الدم وتوجد في التجاويف الأنفية للإنسان والحيوان وعلى الجلد وأجزاء أخرى من الجسم . وهكذا تنتقل للغذاء وينتج هذا النوع من البكتيريا أي *Staphylococcus aureus* بثرات ودمامل ، وجود هذه البكتيريا في الأغذية بأعداد كبيرة ينتج عنه إنتاجها لسموم تسمم الطعام وهذا ما أكده Elahi و آخرون (2002) و Uzunl وآخرون (2002) و Ojokon ( 2006 ) و Vargun و Vatansever ( 2007 ) ، Kocak و آخرون ( 1998 ) .

وكذلك تم عزل جنس البكتيريا *Salmonella* من العينات التي تم تجميعها وهذا اتفق مع Uzunl وآخرون (2004) وOrallo وآخرون (1999) وهذه النتيجة اختلفت مع Windrantz و Arias

(2000) وينسب جنس الـــ *Salmonella* إلى عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* وهي سالبة لصبغة الجرام عصوية الشكل قصيرة هوائية معظمها يخمر الجلوكوز والسكريات البسيطة الأخرى وكذلك تنتج حامضا وغازا . توجد هذه البكتيريا عادة في الجهاز الهضمي بصورة خاصة وتوجد بصورة واسعة في الطبيعة أيضا وهي تسبب التسمم السالمونيللي عند الإنسان جميع أنواع هذا الجنس لا يرغب بوجوده في الأغذية .

بكتيريا.*Shigella spp* تعتبر من عائلة البكتيرية المعوية *Enterobacteriaceae* وهي عصوية قصيرة ، سالبة لصبغة جرام ، غير متحركة ، هوائية ، توجد في المياه الملوثة والقناة الهضمية للإنسان حيث تسبب بعض المشاكل المعوية مصدرها الرئيسي في الأغذية الملوثة وكذلك المياه الملوثة التي بدورها تصل إلى الإنسان عن طريق الأغذية .

وكذلك تم عزل بكتيريا .*Proteus spp* وهي كذلك من عائلة البكتيريا المعوية *Enterobacteriaceae* وتتميز هذه البكتيريا في إنها سالبة لصبغة جرام ذات شكل عصوي وهوائية وجميع أنواعها متحركة وتوجد في القناة الهضمية للإنسان والحيوانات وعلى المواد المتفسخة ويمكن عزلها من البيض واللحوم الفاسدة وبخاصة تلك التي تفسد فوق درجات حرارة التبريد .

واتفقت النتائج مع Anuranjini و آخرون (2008) و Uzunl وآخرون (2002) في عزل جنس *Pseudomonas* من عينات المثلوجات حيث يتبع هذا الجنس العائلة Pseudomonadaceae التي تتميز بأنها خلايا ذات عصيات قصيرة وسالبة لصبغة جرام هوائية وتنتشر أنواعه بصورة واسعة في الطبيعة حيث توجد في التربة والمياه والنباتات والقناة الهضمية للإنسان والحيوانات . ويعتبر هذا الجنس من أهم أنواع البكتيريا التي لها دور في فساد الأغذية عند درجات الحرارة المنخفضة لأنها

محبة للبرودة Psychrophilic ومعظم أنواعها التي تسبب فساد الأغذية لا تنتج صبغة ذائبة في الماء ولكن قد تتفلور تحت الأشعة فوق البنفسجية .

وكذلك تم عزل بكتيريا *Listeria spp.* بنسبة بسيطة حيث كانت 3.3% ، من عينات المثلوجات التي تم تجميعها من الموقع الأول فقط وتتميز هذه البكتيريا بأنها عصيات موجبة لصبغة جرام توجد في الطبيعة ومنها قد تنتقل إلى المثلوجات . وهذه النتيجة اتفقت مع Akman وآخرون (2004) و Windrantz و Arias (2000) و Abrahao و آخرون ( 2008 ) .

و تم عزل بكتيريا *Yersinia spp.* من عينات المثلوجات التي تم تجميعها من الموقع الأول والثالث والرابع بنسب متفاوتة 3.3% ، 18.4% ، 11.1% على التوالي .وهي بكتيريا عصوية سالبة لصبغة جرام غير مخمرة للاكتوز ومن خصائصها قدرتها على التكيف مع مناطق الجسم الغنية بالمغذيات ذات الأوكسجين المنخفض مثل القناة المعدية المعوية Gastrointestinal tract و المهبل Vagina وتجويف الفم ، إضافة إلى وجودها في براز الإنسان بأعداد كبيرة . ونظرا لما تلعبه هذه البكتيريا في التسبب في تلوث الأغذية فإن احتمالية إصابة الأغذية بهذا الميكروب يكون أمرا بديهيا نظرا لالتصاقها بالإنسان الذي بدوره يعتبر العامل الأساسي في عملية تصنيع الأغذية وكذلك مستوى السلامة الصحية غير السليمة المتبعة في المصانع وهذا ما أكده أمل سيد و سيد محمد (2003) و Barbini وstefanini (2000) و Uzunl وآخرون (2002) .

ينشأ التلوث البكتيري عادة من خلال الفشل في التطبيــق السليم لعملية التجهيز والتعبئة . وإن هذا الفشل أو القصور يؤدي في حقيقة الأمر إلى زيادة تجرثم هذه الكائنات الدقيقة للمنتوج الذي بدوره يصل إلى المستهلك في حالة ملوثة . لقد كانت جميع المواقع التي تم العزل منها تمثل

صورة سيئة لعملية تصنيع المثلوجات وهذا ينعكس في الواقع على الأداء الجيد لعملية التوزيع والاستهلاك مسببة في حدوث أمراضا ناشئة من استهلاك المثلوجات الملوثة .

إن طبيعة المواد الخام الداخلة في عملية تصنيع المثلوجات تعتبر من ناحية قيمتها الغذائية غير مطابقة للمواصفات القياسية المعترف بها عالميا نظرا لانتهاء صلاحيتها وكذلك سوء عملية التخزين ، إضافة إلى تدني مستوي نوعية الطرابيش التي توضع بها المثلوجات ( وهي عبارة رقائق من البسكويت ) التي تعتبر من أهم العوامل في الحفاظ على المثلوجات في حالة طازجة للمستهلك . إن السلامة الصحية لعملية تصنيع المثلوجات في جميع المواقع التي تم منها العزل تفتقر إلى المطابقة للمواصفات القياسية وهذا في حقيقة الأمر قد يسبب في تفشي أمراضا قد تلعب دورا خطيرا في إصابة الإنسان . لقد تم ملاحظة العديد من الظواهر الغير صحية في هذه المواقع مثل عدم الاهتمام بتعقيم أللآلات وكذلك عدم الاهتمام بالعناية الصحية للعاملين في هذا القطاع . إن معظم العاملين في هذه المواقع لا يتمتعوا بالعناية الصحية مما يؤدي في زيادة التلوث البكتيري .

لقد لاحظنا خلال زيارتنا إلى مراكز التصنيع عدم الاهتمام بنوعية المياه وتعقيمها . وكما هو معروف تعتبر المـــياه الداخلة في عملية التصنيع من أهم العوامل في سلامة المنتوج . إن الافتقار إلى آلات التقطير والتعقيم يؤدي إلى زيادة نسبة التلوث البكتيري . وهذه الأشياء تم ملاحظتها بوضوح في جميع المواقع التي تم منها جمع العينات .

لقد كانت التيارات الهوائية من أكثر العوامل المسببة للتلوث البكتيري . حيث تم ملاحظة ذلك عند عملية التجهيز في داخل مواقع التصنيع . ويعتبر الهواء من الناحية البيئية من أكثر العوامل التي تلعب دورا أساسيا في عملية نقل الخلايا البكتيرية المعلقة في الهواء إلى داخل المصانع مما قد يسبب في حمل الملوثات البكتيرية المحمولة عن طريق الهواء Airborne bacteria

أثنـــاء عملية التجهيز . لقد كانت معظم المصانع من ناحية السلامة الميكروبيولوجية سيئة جدا نظرا لعدم الوعي بدور الميكروبات في إفساد المنتوج المراد تسويقه .

لقد كانت النتائج المدونة في جميع الجداول تمثل العزلات البكتيرية التي تم عزلها من جميع المواقع متباينة من حيث أنواع العزلات البكتيرية ، حيث تم ملاحظة إن أعلى نسبة تلـــوث كانت من خلال البكتيريا الغائطية *Escherichia coli* وأنواع البكتيريا *Klebsiella spp.* التي تشكل النسبة العالية كما أشرنا في البداية . ولكن أنواع أخرى من العزلات تم الحصول عليها تمثل أنواعا من البكتيريا التي تلعب دورا أساسيا في عملية التلوث ولكن بنسب أقل من البكتيريا *Escherichia coli* والبكتيريا *Klebsiella spp.* . ويرجع السبب في ذلك إلى التباين في انتشار الأنواع البكتيرية في نطاق هذه المواقع من ناحية نسب التلوث البكتيري . حيث كان عدد العزلات ونسبها المئوية لمعظم العزلات البكتيرية تتدرج تدريجيا من الأعلى إلى الأقل من حيث عدد العزلات ونسبها المئوية .

إن التباين في عدد العزلات ونسبها المئوية وأنواعها يرجع في الواقع إلى المتطلبات الغذائية التي توجد في المنتوج . إن معظم أنواع البكتيريا تتباين في احتياجاتها أو في عملياتها الأيضية لمعظم المكونات الموجودة بالفعل فـــــي المثلوجات وهذا ما أشار إليه (Wilson , 2008 ) .وبالتالي فإن التباين في الأنواع المعزولة ليس إلا تباين في المتطلبات الغذائية التي تمثلها هذه الأنواع البكتيرية .

لقد بينت النتائج بأن الانتشار البكتيري في منطقة بنغازي يتباين من منطقة إلى أخرى ويرجع هذا التباين إلى التباين في معدلات السلامة الصحية التي تسهم بشكل أو آخر في ظهور

أنواع من البكتيريا تختلف عن تلك في المناطق الأخرى . إن التلوث البكتيري يعتبر من أهم العوامل التي تسبب في فساد الأيس الكريم إضافة إلى المواد الغذائية التي يستهلكها الإنسان .

أشارت النتائج أن هناك أنواع من البكتيريا تتردد بنسب ضئيلة نظرا إلى الدور غير الأساسي في عملية التلوث . إن معظم هذه السلالات البكتيريا كانت في الواقع تلعب دور مهم في عملية تلوث الأيس الكريم ، إلا أنها ذات دور ثانوي مقارنة بالأنواع ذات الانتشار الواسع مثل البكتيريا *Escherichia coli* والبكتيريا *Klebsiella spp.* التي غالبا ماتسهم مساهمة كبيرة كملوثات ميكروبية خطيرة .

كما أشرنا في البداية ، فإن عملية عدم الاهتمام بالسلامة الصحية وإتباع المواصفات القياسية قد يؤدي إلى تفشي التلوث البكتيري في مراكز تصنيع المثلوجات الذي قد يسبب في حدوث أمراض خطيرة لمستهلكي هذا المنتوج .

## الاستنتاجات

# Conclusions

1. إن أغلب السلالات البكتيرية المعزولة من عينات المثلوجات التي تم دراستها تنتمي إلى العائلة المعوية *Enterobacteriaceae* .
2. شكلت بكتيريا القولون *Escherichia coli* أكبرنسبة انتشار حيث كانت 17.5% ويليها بكتيريا *Klebsiella spp.* التي مثلت أيضا 15.4% .
3. تم عزل بعض الأجناس البكتيرية الممرضة والتي تصنف من أخطر أنواع البكتيريا على صحة الإنسان ومنها البكتيريا الغائطية *E.coli* والكليبسيلا*Klebsiella spp.* و البكتيريا السبحية المنتجة للصديد *Streptococcus pyogenes* ومكورة البكتيريا العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* والبكتيريا الليستيريا *listeria spp.* وكلٍ من البكتيريا اليرسينيا *yersinia spp.* والشيجيلا *shigella spp.* والسالمونيلا *Salmonella* .
4. تسبب معظم أنواع البكتيريا المعزولة أمراضا خطيرة مثل التسمم الغذائي food poising
5. معظم المصانع غير ملتزمة بإجراءات السلامة الصحية Hygenity وخاصة تلك التي تقوم بصناعة المثلوجات يدوياً ، حيث أظهرت النتائج وجود نمو بكتيري كبير بتلك الصـــناعات اليدوية في أطباق العزل .
6. افتقار الكشف الطبي للعاملين في مجال تصنيع المثلوجات .

**7.** عدم الاهتمام بتعقيم الأجهزة والأدوات التي تستخدم في عملية التصنيع .

**8.** عدم الاهتمام بخطوات التعقيم الضرورية .

**9.** من الناحية التطبيقية تعتبر جميع المصانع غير مناسبة صـــناعيا نظـــرا لعـــدم الاهتمـــام بإجراءات التحكم في تيارات الهواء .

## التوصيات

## Recommendations

1. يجب توفر معمل تحليل بكتيري داخل كل مصنع لإنتاج المثلوجات وبذلك يتم التعرف على صحة وسلامة المثلوجات المنتجة و يتم تدوين النتائج لمراقبة مستوى سلامة صناعة المثلوجات داخل المصنع .
2. يجب على أصحاب المصانع تنفيذ اللوائح الخاصة بسلامة المثلوجات والمتمثلة في نظام الصحة الشخصية للعاملين داخل المصنع عن طريق توفير الملابس الواقية ، والكمامات والقفازات الخاصة بالأيدي وذلك لمنع وصول البكتيريا المحمولة بواسطة العاملين إلى المثلوجات المصنعة .
3. يجب التشديد على عمليات التعقيم النهائي داخل المصنع وخاصة المعدات والآلات وخزانات التجميع حيث تتم هذه العملية بنظم متعارف عليها وليس بالطريقة العشوائية.
4. يجب على أصحاب المصانع التأكد من خلو آلات المصنع من أي نمو جرثومي قد يكون موجود في المواقع الحساسة أو النقاط التي تعرف Critical control point (CCP) وهي النقطة الحرجة التي قد يوجد بها تلوث جرثومي قبل إجراء عملية التعبئة .
5. يجب دراسة البيئة المحيطة بالمصنع قبل الشروع في تنفيذه وذلك للتعرف على مصادر التلوث التي قد تتسبب في تلوث المنتج وخاصة مصادر المياه .

6. يجب العناية بعملية نقل المنتجات المصنعة وذلك لتلافي تلوثها بالميكروبات .

7. الاهتمام بتخزين المنتجات في برادات عند درجة حرارة 1-5 م وذلك لمنع البكتيريا من النمو و الاهتمام بتخزين المواد الخام تحت ظروف جيدة التهوية وخالية من الرطوبة .

8. الاهتمام بوضع تواريخ انتهاء صلاحية المنتجات المصنعة وتحديد طرق تخزينها .

9. يجب على الجهات الرقابية التابعة للدولة والتي لها علاقة بالصناعات الغذائية أن تقوم بزيارات ميدانية روتينية لمصانع المثلوجات وذلك للتفتيش والترشيد ويجب أن تتوفر لديهم الإمكانات الحديثة التي تساعدهم في الكشف الصحيح على مستوى السلامة داخل المصانع وعدم الاعتماد على الكشف المظهري .

10. الاهتمام بنوعية السيارات الموزعة للمثلوجات من ناحية الأداء الجيد للحفاظ على المثلوجات من الناحية الميكروبيولوجية .

# المراجع

# REFRENCES

**أولاً : المراجع العربية :**


1. البنا ، عمرو . ( 2001 ). التسمم الغذائي البكتيري والفطري ، توزيع مكتبة المعارف الحديثة ، الإسكندرية ، مصر .
2. الجندي ، محمد مختار . (1977 ). الصناعات الغذائية ، الجزء الثالث ، الناشر مكتبة الأنجلو المصرية ، القاهرة .
3. بنكوسون ، جون و رونسيفالي ، لويس .( 1985 ). أسس علوم الأغذية ، الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر .
4. خليل ، محمد . ( 2006 ) علوم وتكنولوجيا الأغذية ، مكتبة بستان المعرفة .
5. نوفل ، مصطفى . ( 1989 ) . الطرق إلى الغذاء الصحي ، الطبعة الأولى ، توزيع الدار العربية للنشر والتوزيع ، القاهرة ، مصر .

## ثانياً : المراجع الأجنبية :


1. Abrahão,W. Abrahão,P . Monteiro,C and Pontarolo,R . ( 2008 ) . Occurrence of Listeria monocytogenes in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil . *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44(2 ): 289-296.
2. Akman,D. Duran, N and Diúrak,M . (2004) . Prevalence of Listeria Species in Ice Creams Sold in The Citiesof Kahramanmaraß and Adana. Dept . Anatomy, Faculty Medicine, .ukurova University, Adana . Turkey. 34.257-262.
3. Anuranjini,C and Dhanashree,B. (2008) . Bacteriological analysis of ice creams from Mangalore, south India . *Indian J Med Res*, 127. 91-92 .
4. Barbini,B . Stefanini,M . ( 2003 ) . Isolation and Survival Of Yersinia Enterocolitica In ICE Cream at Different PH Values, Stored at -18°C. Brazilian Journal Microbiology . 31:174-177 .
5. Brain,A and Allen,G.( 1982 ) . A chemical approach food science . 4th edition.
6. Elahi , M . Habib , S & Rahman , M . ( 2002) . Sanitary Quality of Commercially Produced Ice Cream Sold in the Retail Stores . Pakistan Journal of Nutrition 1(2): 93-94.
7. Eley, A.( 1996 ). Microbial food poisoning . *Dept Microbiology*.8.12-123 .
8. Fabian,W.(1998). Sanitary Control of Ice Cream. *Dept Bacteriology*,3.596-600
9. Frazier ,W. And westhoff, D. ( 1978 ). Food microbiology .3rd edition .Mc Grew – Hill , Book Company, New York,540pp .

**10.** Graff,J. (1974 ) . The microbiological examination of ice cream manufactured in Ghana . Ghana j , Agri . Sci . 7:227-230 .

**11.** Jay, M. (1986 ) . Modern food microbiology . 3rd edition . Van-Nostrand Reinhold , New York . USA.

**12.** Kocak,C . Akan , M and Yardmc,H( 1998 ). Bacteriological Quality Of ICE Cream Marketed in Ankara. Ankara Univ,Vet. Fak. Derg . 45: 131-134 .

**13.** Kuplulu, O. and Sarimehmetoglu, B. ( 2004 ) **.** Isolation and identification of Brucella spp. in ice cream . *Det Food Hygiene and Technology* .5.(7):511-514.

**14.** Nicklin,J. , K.Graeme-cook and R.Killington . 2nd ed . (2002) . Biddles ltd . Guildford . UK .

**15.** Orallo,G . Pangan,A and Cabrera,C. ( 1999 ) . Microbial analysis of Ice cream Produced by Big-Scale and Small-Scall Manufactured in Metro Manila. *Dept biology* . 28. ( 3 ) : 99-101 .

**16.** Ojokon,A.( 2006 ) . Microbiological Examination of ice cream sold in Akure . Pakistan Journal Nutrition . 5 (6) : 536-538 .

**17.** Potter , N and Hotchkiss, J.( 1995 ). Food science . 5th edition .Chapman & Hall. New York .

**18.** Sayed,A and Sayed,M.(2003). Prevalence Of Some Zoonotic Enteropathogenic Bacteria In Ice Cream . *Dept. Food Hygiene.*, 3 :120-122 .

**19.** Uzunlu,S. Yildirim,I and Demir,M. ( 2004 ) . Survival characteristics of some pathogenic bacteria in vanilla ice cream at different storage periode . Dept.food engineering .,34:195-199 .

**20.** Vargun,F. Vatansever,L.( 2007 ) . Isolation of staphylococci from milk and cream sold at the Kars market and detection of their enterotoxigenicity . *Dept Food Science and Technology* . 63 (5): 538-540 .

**21.** Wagner , J .( 2006 ). Extension Food Technologist . Bacterial Food Poisoning Journal . 2 .320 -326.

**22.** Wilson,C. ( 2008 ) . Microbial food contamination . 2nd edition,CRC press tylor and Francis group.USA.

**23.** Windrantz,P & Arias,M (2000). Evaluation of the bacteriological quality of ice cream sold at san jose , costa rica . faculty microbiology,. 5 (3): 301-303.

**24.** Yaman,H . Elmali,M . Ulukanli,Z . Tuzcu,M .& Genctav,K ( 2006 ) Microbial quality of ice cream sold openly by retail outlets in Turkey. *Det Food Hygiene.* **157**, ( 10 ) : 457-462 .

# Abstract

Fifty samples of different kinds of ice creams were collected and bacteriological experiments have been carried out in order to isolate and identify the pathogenic bacterial species which play an important role in the contamination of the Ice creams which manufactured locally in Benghazi area . These types of bacteria which actually isolated were the followings : *Escherichia coli , Klebsiella spp. , Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Staphylococcus aureus, Salmonella spp. , Pseudomonas aeruginosa, Shigella spp., Proteus spp., Enterococcus faecalis, Listeria spp., Yersinia spp., Streptococcus pyogenes, Streptococcus viridans, Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus cohnii , Pseudomonas putida, Klebsiella oxytoca ,Klebsiella pneumoniae* .

It was clear that most samples which were studied bacteriologically exhibited more different rates of bacteriological contaminations . These samples of the ice cream were not in proper standard in respect of hygienity and quality standard . This study confirmed that the Hygienity procedures were not taken during the time of preparation and assembly of the Ice cream products . Beside of that , there were no actual controlling of the product bacteriologically before final package . A lot of bacterial species have been isolated as we mentioned before which actually play a crucial role in the process of microbial contamination and in causing the human disease .

During this work it was found out that most of the ingredients which actually enter the processes of the ice cream manufacturing did not meet the standard requirements specially the expiry dates and storage .

This study showed that the reasons for the high rates of the bacterial contaminations were due to the low standards of hygienity and quality standard and also to the poor system for periodical medical check up of the workers which normally enhancing the possibility of exposing the product to bacterial contamination. In addition to that , there were bad maintance and sterilization of the instruments and equipments which played a basic role in the processing of the ice cream products.

The water was also playing an important role in the process of manufacturing. So water in most ice cream factories in Benghazi area was contaminated with *E. coli* and other species of *Enterobacteriaceae* which actually lead to the increase of the rate of bacteriological contamination of the product.

# Appendices

# الملاحق

**(A)** Culture media :

**1.** Nutrient agar ( Himedia , India )

| Formula | grams per liter |
|---|---|
| Peptic digest of animal tissue | 5.00 |
| Beef extract | 1.50 |
| Yest extract | 1.50 |
| Sodium chloride | 5.00 |
| Agar | 15.00 |

Direction of use :-

Suspend 28.0 grams in 1000 ml of distilled water . Heat to boiling to dissolve the medium completely . Sterilize by autoclaving at 121˚C for 15 minutes . The medium was cooled to about 50˚C and poured into plates or tubes .

**2.** Blood agar ( oxoid , England )

| Formula | grams per liter |
|---|---|
| Peptone mixture | 16.0 |
| D-Glucose | 0.5 |
| Yeast extract | 2.0 |
| Sodium chloride | 7.0 |
| Agar | 12.0 |

Direction of use :-

37.5 g of the ready medium were suspended in 1 liter of distilled water . The medium was completely dissolved by heating to the boiling and then sterilized by autoclaving at 121˚C for 15 minutes . The medium was cooled to about 50˚C and aseptically 7% v/v sterile defibrinated blood was added and mixed . and immediately dispensed in plates or tubes .

**3.** MacConkey agar ( oxoid , England )

| Formula | grams per liter |
|---|---|
| Lactose | 10.0 |
| Peptone | 20.0 |
| Bile salt | 5.0 |
| Sodium chloride | 5.0 |
| Neutral red | 0.03 |
| Agar | 15.0 |

Direction of use :-

Suspend 55 g in 1 liter of distilled water . Bring to the boiling to dissolve completely . Sterilize by autoclaving at 121˚C for 15 minutes . The medium was then cooled to about 47 ˚C and poured into plates .

**(B)** Biochemical test on selective and differential media :

**1.** Triple sugar iron test ( TSI ) ( Himedia , India )

| Formula | grams per liter |
|---|---|
| Peptic digest of animal tissue | 10.0 |
| Casien enzymic hydrolysate | 10.0 |
| Yeast extract | 3.0 |

| | |
|---|---|
| Beef extract | 3.0 |
| Lactose | 10.0 |
| Sucrose | 10.0 |
| Dextrose | 1.00 |
| Sodium chloride | 5.0 |
| Sodium thiosulphate | 0.30 |
| Ferrous sulphate | 0.20 |
| Phenol red | 0.024 |
| Agar | 12.0 |

Direction of use :-

Suspend 65.0 g in 1000 ml distilled water . Heat to boiling to dissolve the medium completely , mix well and distribute into test tubes . Sterilize by autoclaving at 10 ibs pressure ( 115 c̊) for 15 minutes . Allow the medium to set in sloped from a butt about 1 inch long . This medium was used for identification of Gram-negative enteric bacilli on the basis of dextrose lactose and sucrose fermentation and hydrogen sulphid production .

**2.** Simmon citrate agar ( Himedia , India )

| Formula | grams per liter |
|---|---|
| Magnesium sulphate | 0.20 |
| Ammonium dihydrogen phosphate | 1.00 |
| Dipotassium phosphate | 1.00 |
| Sodium citrate | 2.00 |
| Sodium chloride | 5.00 |
| Bromo thymol blue | 0.08 |
| Agar | 15.0 |

Direction of use :-

Suspend 24.0 g in 1000 ml distilled water . Heat to boiling to dissolve the medium completely , mix well and distribute into test tubes . Sterilize by autoclaving at 10ibs pressure ( 115 c˚) for 15 minutes . Allow the medium to set in sloped from a butt about 1 inch long . This medium was used for differentiation between *E.coli* and *Klebsiella* .

**3.** Mannitol salt agar ( Himedia , India )

| Formula | grams per liter |
|---|---|
| Peptic digest of animal tissue | 5.00 |
| Pancreatic digest of casein | 5.00 |
| Beef extract | 1.00 |
| Sodium chloride | 75.0 |
| D-mannitol | 10.0 |
| Phenol red | 0.025 |
| Agar | 15.0 |

Direction of use :-

Suspend 111g in 1 liter of distilled water . Bring to the boiling to dissolve completely . Sterilize by autoclaving at 121˚C for 15 minutes . The medium was then cooled to about 47 ˚C and poured into plates . This medium was used for selective isolation and differentiation of *Staphylococcus aureus* .

**(C)** Antibiotics Sensitivity tests ( Himedia , India )

1. Bacitracin for identification of *Streptococcus pyogenes* .
2. Optochin for identification of *Streptococcus pneumoniae*
3. Polymyxin for differentiation between *Staphylococcus saprophyticus* and *Staphylococcus epidermidis* .

**(D)** Stains

Gram stain :

Crystal Violet 0,5 %

Lugol's iodin ( 1g iodine , 2g potassium iodine in 100 ml D.W ) .

Ethyl alcohol or Acetone 95 %

Safranine 0.5 %

**(E)** Reagents and equipments

1. Oxidase reagent (Himedia , India ) .
2. Kovac's reagent ( Himedia , India ) .