تشخيص بكتيريا *Salmonella spp.* المعزولة من الأجبان البيضاء المصنعة من حليب الغنم بالاعتماد على تقنيتي API وPCR

صياح أبو غرة[1] و سمير سليق[1] و عهد أبو يونس[1]

الملخص

هدف البحث إلى عزل بكتيريا السالمونيلا من الأجبان البيضاء المصنعة من حليب الغنم بالطريقة التقليدية وتشخيصها بالاعتماد على نظام API 20E وتقنية PCR. من أجل ذلك أُحضرت 80 عينة من الجبن الأبيض المصنع من حليب الغنم من مناطق مختلفة في سورية، أعطت 17 عينة منها نتيجة إيجابية لوجود السالمونيلا فيها باستخدام تقنية الـ PCR، ومن ثم فإن نسبة العينات المخالفة للمواصفة القياسية السورية هي 21.25 %، وبتحديد أنواع السالمونيلا المعزولة باستخدام نظام API 20E لوحظ أن النوع السائد من السالمونيلا في هذه الأنواع من الأجبان هو *S.arizona* بنسبة 47%، وبعده جاء *S.typhimurium* بنسبة 23.61%، وأخيراً النوع *S.paratyphi* بنسبة 17.6%، وبقي 11.76% تابعاً للجنس دون تحديد النوع *Salmonella* spp. وقد لوحظ أن عدد العينات الإيجابية لوجود السالمونيلا في الجبن البلدي أكبر بكثير من الجبن العكاوي، كما لوحظ أنه يمكن استخدام تقنية الـ PCR للكشف عن وجود السالمونيلا في الأجبان بشكل سريع ودقيق.

الكلمات المفتاحية: الأجبان البيضاء، السالمونيلا، API system ، PCR.

[1] قسم علوم الأغذية، كلية الزراعة، ص.ب. 30621 ، جامعة دمشق، سورية.

Identification of *Salmonella spp*. isolated from white cheese (processed from sheep milk) by using API and PCR techniques

S. Abou Ghorra[(1)]; S. Slik[(1)] and A. Abou Younes[(1)]

ABSTRACT

The objective of this investigation was the Identification of *Salmonella spp*. isolated from white cheese (traditional processed from sheep milk) and classify it by using API 20E and PCR techniques.

80 samples of white cheese (traditional processed from sheep milk) were collected from different locations in Syria.

According to PCR technique, 17 samples gave positive result for *salmonella* meaning that 21.25 % did not match the levels of the Syrian Standardization and Metrology (S.S.M.).

According to API 20E technique, the dominat type of Salmonella was *Salmonella Arizona* (47%), followed by *Salmonella typhim* (23.61 %), *Salmonella paratyphi* (17.6 %) and *Salmonella spp.* (11.76 %).

Results showed that samples from local cheese positive for *Salmonella* were much more than samples from Akkawi cheese.

The results showed that the PCR technique is fast and accurate and can be used to Identify *Salmonella* in cheese.

Key Words: White cheese, *Salmonella spp.*, API and PCR technique.

[(1)] Dep. food sciences ,Facu.,Agric.,P.O.Box 30621. univ. Damascus.

المقدمة

تعدّ الأجبان البيضاء السورية بشكل عام والمصنعة من حليب الغنم بشكل خاص من الأجبان الطازجة الطرية التي يصنع معظمها بطرائق تقليدية ضمن ورشات صغيرة غير مرخصة صحياً أو داخل بعض المنازل الريفية وفقاً لوصفات قديمة تقليدية. فحليب الغنم المستخدم في هذه الصناعة لا يخضع -في أغلب الأحيان- إلى أية معاملة حرارية كافية للقضاء على الأحياء الدقيقة الممرضة التي قد توجد فيه (سليق وأبو غرة، 2007)، وهذا ما دفعنا إلى إجراء تحليل ميكروبيولوجي للأجبان البيضاء الطازجة السورية المصنعة من حليب الغنم للتحري عن وجود بكتيريا مرضية فيها علنا نسهم في تسليط الأضواء على خطورة استهلاك هذه الأجبان في وضعها الحالي.

الدراسة الميكروبيولوجية للجبن الأبيض:

تنتشر صناعة الأجبان البيضاء المملحة في بلدان الشمال الشرقي لحوض البحر الأبيض المتوسط، وفي بلاد البلقان، وهي تُصنع بطرائق تقليدية إذ إنّ نسبة الملح المرتفعة بها تعمل على حفظها مدة طويلة (Bintsis and Papademas, 2002)، وتعدُّ الأجبان من وجهة نظر ميكروبيولوجية بيئات زرع جامدة تمكن بعض الأحياء الدقيقة من النمو والتكاثر فيها، ومن ثمَّ فإنّ نواتج استقلاب هذه الميكروبات يمكن أن تبقى نشطة عند استهلاك هذه الأجبان طازجة (Beerens and Luquet, 1987). كما أثبت كل من Sharpe وBramley عام 1977 أن البكتيريا الممرضة في الحليب الطازج، مثل أغلب الأحياء الدقيقة الأخرى تبقى حية في الأجبان القاسية المنضجة مدة طويلة من الوقت، وفي الأجبان الطرية الطازجة حتى استهلاكها، لذلك يجب عدم استخدام حليب ملوث بالبكتيريا الممرضة في تصنيع الجبن إلا إذا أخضع لمعاملة حرارية مناسبة للقضاء عليها.

وقد استطاع Kaplan وزملاؤه عام 1962 أن يثبتوا أن الأحياء الدقيقة الممرضة وسمومها تنتقل إلى الأجبان من الحليب الذي صنعت منه. لذلك ينصح بإجراء عملية غلي للأجبان الطازجة قبل استهلاكها (السيد شحاته، 1997)، إن عملية الغلي هذه تعدُّ طريقة مجدية في حفظ المواد الغذائية بشكل عام، والأجبان بشكل خاص، فضلاً عن دورها في تعزيز نكهة الأجبان البيضاء إلا أنّها وفي الوقت نفسه تؤدي إلى تدهور في القيمة الغذائية للأجبان (Malone *et al.*, 2003).

بكتيريا السالمونيلا *Salmonella*:

تنتمي هذه البكتيريا إلى عائلة Enterobacteriaceae، وقد سميت كذلك نسبة إلى سلمون Salmon الذي عزل عصيات سالمونيلا كوليرا الخنازير عام 1885، وهي عبارة عن عصيات صغيرة الحجم، سالبة الغرام، متحركة بواسطة أهداب محيطية هوائية أو لا هوائية

اختيارياً، يمكنها تخمير الغلوكوز مع إنتاج الغاز والحمض، إلاَّ أنّها لا تستطيع أن تخمر السكروز واللاكتوز، وهي قادرة على إنتاج غاز الكبريت H_2S (Shen *et al.*, 2007).

طرائق الكشف عن بكتيريا السالمونيلا *Salmonella*:

هناك العديد من طرائق الكشف عن البكتيريا المنتقلة عبر الغذاء والمسببة للأمراض عند الإنسان كالـ *Salmonella* (Pitcher and Fry, 2000)، هذه الطرائق تتقاطع فيما بينها للسعي للحصول على نتائج سريعة، إلاَّ أنّها تختلف فيما بينها في طريقة العزل والإغناء والتفريق (Stevens and Jaykus, 2004)، وعلى الرغم من استخدام الطرائق التقليدية في الكشف مدة طويلة لدقتها العالية (Lazcka *et al.*, 2006)، إلاَّ أنَّه يجري السعي بشكل دائم لاستنباط طرائق حديثة في تحديدها بأسرع وقت ممكن وبأكثر دقة ممكنة، إذْ تمكن الباحثون من استخدام تقنية التفاعل التسلسلي البوليميرازي PCR (Polimrase Chain Reaction) للكشف عن وجود السالمونيلا أو عدم وجودها في منتج معين خلال ساعات كما تمكنوا من تحديد هويتها ونوعها باستخدام تقنية التعرف إلى الأحياء الدقيقة عبر دراسة تخميرها لبعض السكريات API (Analytical Profile Index) (Lazcka *et al.*, 2006)؛ (Leonard *et al.*, 2003).

تتكون تقنية الـ API 20E من شريط بلاستيكي عليه أنابيب دقيقة تحتوي المواد الخاصة بالتفاعلات البيوكيميائية مجففة، توسعت هذه التقنية عام 1976 لتضم بكتيريا أخرى سالبة الغرام (Brooks *et al.*, 1974). وتستخدم تقنية الـ API 20E للكشف عن البكتيريا التابعة لعائلة *Enterobacteriaceae*، ومنها جنس الـ *Salmonella*، إذ بواسطتها يُكشف عن ستة أنواع تابعة لهذا الجنس وهي (*S. arizonae, S. choleraesuis,* (*S.gallinarum, S. paratyphi A, S. pullorum, S. typhi,* فضلاً عن أنّه يُرمز لبقية الأنواع التي لا يمكن تحديدها بـ *Salmonella* spp) (Gillespie *et al.*, 2005).

أمّا تقنية PCR فتعتمد على تضخيم قطعة محددة من المادة الوراثية، وقد استخدمت في منتصف الثمانينيات، تحتاج هذه التقنية إلى مدة قصيرة لا تزيد على 24 ساعة فضلاً عن أنها لا تحتاج إلى عملية إغناء مسبقة (Lazcka *et al.*, 2006). إلا أنها تحتاج إلى مرئسات (Primers) تتوافق مع أنواع البكتيريا المراد الكشف عنها (Touron *et al.*, 2005)، ويؤخذ على تقنية PCR عدم إمكانية استخدامها للكشف عن التعداد الحقيقي للبكتيريا الحية؛ وذلك لأنها تعتمد على المادة الوراثية (Yaron and Mathews, 2002). وقد جرى على هذه التقنية كثير من التطوير للحصول على نتائج دقيقة بأقل فترة ممكنة في الكشف عن بكتيريا السالمونيلا في الأغذية (Knight *et al.*, 1990)، وهي تحتاج إلى تعداد من بكتيريا السالمونيلا بين 10^3 – 10^4 خلية/ غرام، في حين أن الدراسات أثبتت أن الجرعة الممرضة تراوح بين 10^1 و10^5 خلية/ غرام (Lin and Tsen,1996، Greenwood and Hooper, 1983، Fontaine *et al.*, 1980)، وقد اعتمد Lin و Tsen

عام 1996 على مورثة 16sRNA في تحديد جنس السالمونيلا في الأغذية لأنّها مورثة محافظة ضمن الجنس إذْ ما تزال هذه المورثة معتمدة إلى يومنا هذا. وقد أوصى Greenwood وزملاؤه عام 1998 بإدخال تقنية PCR في الكشف عن البكتيريا التابعة لجنس السالمونيلا في الأغذية واعتمادها بوصفها طريقة تحليل سريعة وموثوق بها تحلّ مكان الطرائق التقليدية في الكشف.

هدف البحث

إلى عزل بكتيريا *Salmonella* من الأجبان البيضاء المصنعة من حليب الغنم بالطريقة التقليدية وتشخيصها بالاعتماد على تقنيتي *API 20E* و PCR ومقارنة النتائج بما ورد في المواصفة القياسية السورية من حيث إنّه يجب عدم وجود هذه البكتيريا الخطرة في المنتجات الغذائية السورية.

مواد البحث وطرائقه

أجري تحليل ميكروبيولوجي لـ (80) عينة من الجبن الأبيض المصنع من حليب الغنم جُمعتْ من أماكن متفرقة من مدينة دمشق وضواحيها، وكذلك من مدينة حمص وحماه ودرعا وحلب والبادية، وذلك على مدار عام كامل وبحدود 10 عينات في كل شهر، وقد اختلفت طريقة أخذ العينة من قوالب الأجبان البيضاء باختلاف حجم القالب، ففي حالة القوالب الصغيرة أُخذ بعض منها عشوائياً كعينات، أمّا في حالة القوالب كبيرة الحجم فجرت الاستعانة بمسبر خاص معقم، حيث أُدخل المسبر في القالب أفقياً لأخذ مقطع أفقي أسطواني الشكل، كما أُدخل مرة أخرى عمودياً لأخذ مقطع عمودي منه ومُزج المقطعان مع بَعضهما للحصول على عينة تمثل القالب بشكل صحيح. بعد ذلك وُضعت العينات في أكياس خاصة معقمة ومحكمة الأغلاق، ونقلت مباشرة إلى المخبر بواسطة مبرد في درجة 4 ْم، علماً أن الكشف جرى في اليوم نفسه، أو بعد 24 ساعة من حفظ العينات في البراد.

- من أجل الكشف وعزل البكتريا التابعة للجنس السالمونيلا بالطريقة التقليدية. اتُّبعت المراحل الآتية (Anderson 1992)؛ (Bej *et al.*, 1994):
- مرحلة الإغناء الأولي في بيئة سائلة غير انتقائية.
- مرحلة الإغناء في بيئة سائلة انتقائية.
- مرحلة العزل في بيئات جامدة انتقائية.
- مرحلة التأكد والتثبت من المستعمرات المعزولة المشكوك بها.

1 - مرحلة الإغناء الأولي في بيئة سائلة غير انتقائية: الهدف من هذه المرحلة هو إعادة تنشيط نمو السالمونيلا وزيادة حيويتها. والوسط المستخدم في هذه المرحلة هو Buffer Peptone Water (BPW)، بعد تحضير هذا الوسط يُوزَّعُ في دوارق مخروطية بحجم /500/مل حيث يُوزَّع /225/مل من الوسط في كل دورق، بعد التعقيم في درجة حرارة /121/م مدة 20 دقيقة يُوزَنُ وبشكل معقم /25/غ من عينة الجبن المراد اختبارها وتوضع في الدورق الحاوي على /225/مل من (B.P.W) المعقمة، ومن ثمَّ نحصل على تخفيف قدره10/1، نمزج بشكل جيد ونحضن في درجة حرارة 37 م مدة 16-20 ساعة.

2- مرحلة الإغناء في بيئة سائلة انتقائية: في هذه المرحلة يُنشَّطُ ويُحفَّزُ النمو للسالمونيلا، وفي الوقت نفسه يُحدُّ من نمو الأنواع البكتيرية الأخرى. الوسط المناسب لهذه المرحلة هو Rappaport Vassiliadis Soy Broth (R.V.S) في هذا الوسط (R.V.S) فإنّ أخضر المالاكيت يعمل على تثبيط نمو الأنواع البكتيرية الأخرى باستثناء السالمونيلا، في حين تعمل فوسفات البوتاسيوم واقياً للمحافظة على pH الوسط دون تغيير خلال مدة التخزين، أمّا تركيز كلور المغنزيوم فهو الأفضل من أجل الحصول على إغناء جيد للمرق وتقديم النمو الجيد للسالمونيلا.

أمَّا طريقة العمل فبعد تحريك بيئة الإغناء الأولية (B.P.W) الملقحة بالعينة المختبرة والمحضنة سابقا، يؤخذ منها 0.1 مل ويلقح بها أنبوب يحوي على 10 مل من بيئة الـ (R.V.S) المحضرة مسبقاً والمعقمة، ويجري التحضين في درجة حرارة 42+1 ْم مدة 18-24 ساعة.

3 - مرحلة العزل في بيئات جامدة انتقائية: في هذه المرحلة يجري تقييد وحصر أكثر لنمو الأنواع البكتيرية الأخرى وفي الوقت نفسه يجري العمل على تحفيز نمو السالمونيلا وتنشيطه، ومن جهة أخرى فإنّ البيئات الانتقائية المستخدمة في هذه المرحلة تسمح بنمو السالمونيلا على شكل مستعمرات ذات مظاهر مميّزة. توجد عدة أوساط جامدة انتقائية اختير منها الوسطان الآتيان:

- آغار هيكتون Hektoen Enteric Agar (H.E) و Bismuth Sulphite Agar(B.S).

أمّا طريقة العمل فابتداءً من الأنابيب الملقحة سابقاً في المرحلة الثانية في بيئة (R.V.S) يجري الزرع وعلى مكررين وبواسطة إبرة التلقيح في أطباق بتري حاوية على أوساط (H.E) و(B.S) المحضرتين حديثا. تحضن في درجة حرارة 37 م مدة 24-48 ساعة. أمّا النتائج فتكون على الشكل الآتي:

- إن مستعمرات السالمونيلا النامية في بيئة آغار هيكتون (H.E) تكون خضراء مزرقة مع مركز أسود وأحياناً دون المركز الأسود.

- أمّا المستعمرات النامية في (B.S) فتظهر بمركز أسود محاطة بطرف واضح أو فاتح، كما يمكن أن يكون الطرف هو عبارة عن راسب أسود مع لمعة معدنية واضحة، وأحياناً أخرى تكون المستعمرات بنية أو خضراء أو رمادية.

4- مرحلة التأكد والتثبت من المستعمرات المعزولة المشكوك بها: للتأكد والتثبت تُعزلُ مستعمرتان على الأقل ذات مظهر تقليدي للسالمونيلا من كل واحد من أطباق بتري الحاوية على البيئات الجامدة الانتقائية السابقة، وتزرع كل مستعمرة في الأوساط الآتية: (TSI) Triple Sugar Iron Agar و(LIA) Lysine Iron Agar، حيث يجري الزرع بواسطة إبرة التلقيح على السطح المائل للأنبوب الحاوي على هذه الأوساط بطريقة النثر أولاً، ومن ثم في قاع الأنبوب بطريقة الوخز. تحضن الأنابيب الملقحة في بيئة (TSI) في درجة 37 م مدة 24 ساعة، والأنابيب الملقحة في بيئة (LIA) في درجة 37 م مدة 48 ساعة.

أمَّا النتائج فتقرأ على الشكل الآتي:

- تعطي السالمونيلا ردود الفعل التالية في بيئة (T.S.I): قلوي أحمر على السطح المائل للبيئة في الأنبوب، وحامضي أصفر في قاع الأنبوب مع إنتاج H_2S أو من دونه (اسوداد أو دون اسوداد للبيئة).
- بينما تعطي السالمونيلا ردود الفعل التالية في بيئة (L.I.A): قلوي أحمر في قاع الأنبوب وإنتاج H_2S أي اسوداد للبيئة.

تُنْتقى المزارع التي أظهرت نموات مميزة للسالمونيلا في بيئة (T.S.I) كلّها حتى لو توافقت أو لم تتوافق مع نموات مميزة في بيئة (L.I.A). يجب عدم التخلص (استبعاد) المزارع التي أظهرت نموات تقليدية مميزة في بيئة (L.I.A)، ولو لم تتوافق مع نمو تقليدي في بيئة (T.S.I)، ويتم التخلص من المزارع التي لم تظهر نمواً تقليدياً في كل من بيئتي (L.I.A) و (T.S.I).

- كما كُشفَ عن وجود السالمونيلا باستخدام طريقة الـ PCR وفقاً للخطوات الآتية:

جرت الاستعانة بتقنية تفاعل البلمرة المستمرة PCR (Polymerase Chain Reaction)، وهي تقنية تعتمد على تحديد شدفة (fragment) بالاستعانة بمورثتي الـ 16sRNA لتمييز بكتيريا *Salmonella* spp. بحسب Tsen وLin عام 1996، حيث صُمّمت مرئسان primer (II R ,I W) المبينة في الجدول (1) مع أطوال الشدفة التي تنتج عنهما مقدرة بالشفع الأساسي ((Base Pairs (bp)، وذلك باستخدام البرنامج الخاص بتصميم المرئسات (NTI Vector).

الجدول (1) المرئسات المستخدمة وتسلسلها وأطوال الشدف

المرئسة	التسلسل	طول الشدفة bp
I W	5'- ATGCAAAGCCCGACCATGACG -'3	800
II R	5'- GTATCGACCACCACGATGGTT -'3	

جُمعت بكتيريا *Salmonella* التي بعمر 24 ساعة من أطباق بيئة آغار هيكتون (H.E) ووُضعت في 100 µl ماءً مقطراً معقماً منزوع الشوارد ضمن أنبوب ابندورف للحصول على مادة DNA بحسب (Lin and Tsen,1996)؛ (Fitts *et al.*, 1983)، بإضافة 200 µl من TRI (Tri sodium citrate) ثم وُضعَ المزيج ضمن جهاز أمواج فوق صوتية مدة 15 ثانية، وأضيف بعدها 400 µl من فينول كلوروفورم Phenol Chloroforme، ليثفل المزيج مدة 5 دقائق عند درجة حرارة المخبر بسرعة 14000 دورة/دقيقة. نُقل الطافي –بعد انتهاء التثفيل– إلى أنبوب ابندورف آخر، وأضيف إليه 40 µl من خلات الصوديوم، ثم مزجت محتويات الأنبوب جيداً، وأضيف إليه 1 مل من الإيتانول البارد 100%، وأعيد التثفيل بسرعة 14000 دورة/دقيقة عند درجة 4 ْم، تم التخلص من الطافي وأضيف إيتانول 70% وأعيد التثفيل مدة 5 دقائق ليعاد التخلص من الطافي ويترك الراسب ليجف، بعدها أضيف إليه 20 µl من TE (Tris EDTA)، وحفظ الدنا (DNA) عند درجة حرارة - 20 ْم.

ومن أجل إجراء تفاعل PCR حضر مزيج بحجم 25 µl، احتوى على 2 µl من معلق DNA، بالإضافة إلى 2.5 µl من المحلول الموقي (Reaction Buffer 10X)، 3 µl من كلوريد المغنيزيوم $MgCl_2$(50 nM)،0.5 µl من مزيج من النكليوتيدات (dNTP) (بتركيز نهائي في التفاعل 1 p.mol / µl) من شركة Eurobio - فرنسا،1 µl من مزيج زوج المرئسات الموضح بالجدول (1)، و1 µl من أنزيم البوليمراز (DNA polymerase)، وأكمل الحجم باستخدام ماء مقطر.

اعتمد برنامج التفاعل التسلسلي للبوليمراز PCR باستخدام جهاز PCR من شركة .PCR system 9700 - GENE Amp - أمريكا، وقد تكون البرنامج من 30 دورة، حيث شمل البرنامج مرحلة التمسخ (Denaturation) 94 ْم مدة 45 ثانية، ومرحلة الالتحام (Annealing) 60 ْم مدة 45 ثانية، ومرحلة الاستطالة (Extension) 72 ْم مدة 45 ثانية، كما تضمن برنامج التحضين عند الدرجة 92 ْم مدة 10 دقائق لدورة واحدة، وفي نهاية الدورات حضنت المحتويات في الدرجة 72 ْم مدة 10 دقائق كمرحلة استطالة نهائية (Final extension)، وحُفظت نواتج التفاعل في الدرجة 4 ْم.

رُحلت نواتج التفاعل على هلام آغاروز (Agarose gel) تركيزه 1.5% في محلول Tris–EDTA (TE) من شركة Eurobio - فرنسا، كما جرت الاستعانة بعياري الوزن الجزيئي للدنا (DNA Marker) من شركة Eurobio – فرنسا. وقد استخدم جهاز الرحلان الكهربائي (Electrophorese) من شركة BIO RAD - أمريكا، بجهد (فرق كمون) 85 فولطاً، وشدة تيار 150 أمبيراً مدة ساعة، وبعد انتهاء المدة دُرست الحزم المتشكلة وحُلّلت الصور باستخدام جهاز gel Doc من شركة UVITEC – انكلترا.

- كما حُدّدت هوية بعض المستعمرات الميكروبية المعزولة بالأوساط الانتقائية السابقة بالاستعانة بلوحات الـــ API 20E لتحديد الأنواع التابعة لجنس السالمونيلا.

جرت دراسة إحصائية باستخدام برنامج التحليل الإحصائي MSTATC، وباســتخدام طريقة التصميم العشوائي الكامل، بالاعتماد على عاملين وأربعة مكررات لكل عامل وعند مستوى معنوية 5%، العامل الأول كان نوع الجبن (بلدي، عكاوي)، والعامل الثاني كــان منطقة جمع العينات، أمّا المتغيرات فكان وجود بكتيريا السالمونيلا في العينات.

النتائج والمناقشة

تناولت الدراسة نحو 80 عينة من الجبن الأبيض المحلــي المــصنوعة مــن حليــب الأغنام، أُحضرتْ من أماكن متفرقة من القطر (الأكثر شهرة في تصنيع مثل هذه الأجبان مثل دمشق وحماة وريف دمشق و درعا.... الخ)، وفي الجدول (2) عُبر عن النتائج التي حصلنا عليها بوجود وجود بكتيريا السالمونيلا أو عدم وجودها فــي 25 غ مــن العينــة المختبرة من الجبن.

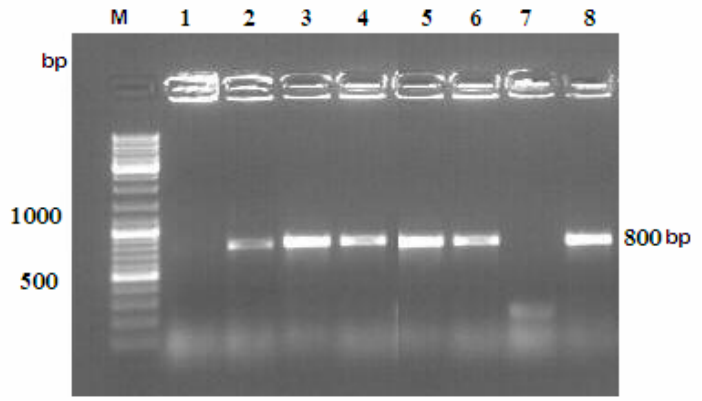
الجدول (2) نتائج الكشف عن وجود السالمونيلا

مصدر العينات	عدد عينات الجبن العكاوي المختبرة	عدد العينات الموجبة لوجود السالمونيلا	عدد عينات الجبن البلدي المختبرة	عدد العينات الموجبة لوجود السالمونيلا
دمشق	11	1	14	5
ريف دمشق	7	2	11	3
حماة وريفها	9	صفر	3	2
حمص	-	-	11	3
حلب	-	-	2	صفر
البادية	5	صفر	5	صفر
درعا	-	-	2	1
المجموع	32	3	48	14

يظهر الجدول (2) أن عدد العينات المختبرة التي أعطــت نتيجــة إيجابيــة لوجــود السالمونيلا بلغت 17 عينة من كلا النوعين من الجبن (العكاوي والبلدي)، ومن ثــمَّ فــإنّ نسبة المخالفة للمواصفة القياسية السورية هي 21.25% من العينات المختبرة.

وجدت الدراسة الإحصائية فروقاً معنويةً بين نوعية الجبن (بلدي أو عكاوي) ووجــود بكتيريا السالمونيلا وبلغت قيمة LSD 1.69 عند مستوى 1%. في حين لم تكــن هنــاك فروق معنوية بين مناطق جمع العينات على اختلافها، وهذا يعني تركيز الإصابة في جبن الغنم البلدي بشكل أكبر بكثير من الجبن الغنم العكاوي؛ وربما يعود ذلك إلى ارتفاع نسبة الملوحة في الجبن العكاوي عنه في الجبن البلدي.

نتائج تقنية PCR: استخدمت المرئسات I W و II R لتمييز البكتيريا التابعة لجنس السالمونيلا المعزولة على البيئات الانتقائية التي بلغت 17 سلالة، وأعطت مستعمرات نموذجية. حُدّدت شدفة بطول bp800، واستخدم كشاهد سلبي سلالة معزولة من أحد الأطباق ولم تُعط مستعمرات نموذجية، أمّا الشاهد الإيجابي فكان سلالة *Salmonella typhi* معزولة ومَنمطة في مخبر ميكروبيولوجيا الألبان في قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة، وتظهر الصورة (1) عصابات بطول bp800 بالاعتماد على عياري الوزن الجزيئي للدنا (100bp Ladder) في المسار M.



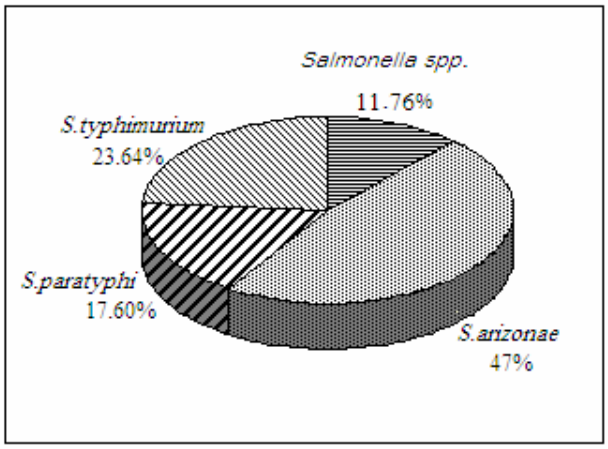
الصورة (1) المسارات 2 وحتى 6 سلالات السالمونيلا معزولة من الجبن الأبيض، 8: سلالة نقية (شاهد إيجابي)، 7: سلالة لم تُعط مستعمرات نموذجية (شاهد سلبي)، 1: تفاعل PCR خالي من مادة DNA، M: ماركر.

نتائج نظام API20 E:

عدد السلالات	النوع	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY
8	*S. arizonae*	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
4	*S.typhimurium*	-	±	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	±	+	+	-	+	-
3	*S.paratyphi*	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
2	*Salmonella spp.*	-	±	+	+	±	+	-	-	-	-	-	+	+	±	+	+	-	+	-

علما: ONPG: اختبار (O-Nitrophenyl–β-D- galactopyranoside)، ADH: اختبار تفكيك الأرجنين.، LDC: اختبار تفكيك الليزين.، ODC: اختبار تفكيك الأورنثين. CIT: اختبار سيمون سيترات. H_2S: اختبار إنتاج غاز كبريت الهيدروجين. URE: اختبار تفكيك اليوريا. TDA: اختبار تفكيك التربتوفان. IND: اختبار الأندول. VP: اختبار فوكس بروسكاور. GEL: اختبار تفكيك الجيلاتين. GLU: اختبار تخمير سكر الغلوكوز. MAN: اختبار تخمير سكر المانيتول. INO: اختبار تخمير سكر الإنوسيتول. SOR: اختبار تخمير سكر السوربيتول. RHA: اختبار تخمير سكر الرامنوز. SAC: اختبار تخمير سكر السكروز. MEL: اختبار تخمير سكر الميليبيوز. AMY: اختبار تخمير سكر الأميغدالين.

تحديد أنواع بكتيريا السالمونيلا في الأجبان البيضاء المصنعة من حليب الغنم بواسطة نظام API 20 E، فقد كان النوع السائد *S.arizona* بنسبة 47%، ويشكل النوع *S. typhimurium* نسبة 23.64 %، أمّا النوع *S.paratyphi* فبلغت نسبة وجوده من الأنواع 17.6 %، وبقي 11.76% تابعاً للجنس دون تحديد النوع *Salmonella sp.*، ويوضح المخطط نسبة الأنواع المعزولة.



الاستنتاجات

1- توجد السالمونيلا في 21.25 % من عينات الجبن المدروسة؛ وهي بذلك مخالفة للمواصفة القياسية السورية التي اشترطت عدم وجودها.

2- لم تلاحظ الدراسة أي فروق معنوية بين المناطق التي سحبت منها العينات، وإنما كان هناك فروق بحسب نوع الجبن (بلدي أو عكاوي)، إذ كانت العينات الإيجابية في الجبن البلدي أكثر بكثير من الجبن العكاوي.

3- من الممكن استخدام تقنية PCR للكشف عن وجود البكتيريا التابعة لجنس السالمونيلا بشكل سريع ودقيق في الأجبان بشكل عام، وخاصة أن المواصفة تشددت بعدم وجود هذه البكتيريا بشكل عام دون تحديد النوع.

4- إن أكثر أنواع السالمونيلا وجوداً في الأجبان البيضاء السورية هو النوع *S.arizona* (47%)، يليه النوع *S. typhimurium* (23.64 %)، ثم النوع *S.paratyphi* (17.6 %).

REFERENCES المراجع

1. **Anderson, M. R. P. 1992. "Microbiologia Alimentaria" in "Metodologia analitica para alimentos" Y bebidas Ed. Diaz De Santos, S.A. Juan Bravo, 3-A,28006, Madrid (Espania).**
2. **Beerens, H. and Luquet, F. M. 1987. "Guide Pratique Danalyse Microbilogique Des Laits Et Desproduits Laitiers" Lavoisier -Paris**
3. **Bej A. K., Mahbubani M. H., Boyce M. J. and Atlas R. M. 1994. "Detection of *Salmonella* spp. in Oysters by PCR" Applied and Environmental Microbiology, 60(1):368-373**
4. **Bintsis, T. and Papademas, P. 2002. "microbiological quality of white brined cheeses" International Journal of Dairy Technology. 55 – 53**
5. **Brooks K. A. M. Jeno, and T. M. Sodeman. 1974. "Clinical evaluation of the API microtube system for identification of Enterobacteriaceae" Med. Technol. 40:55-61.**
6. **Fitts, R., M. Diamond, C. Hamilton, and M. Neri. 1983. DNA: DNA hybridization assay for detection of Salmonella spp. in foods. Appl. Environ. Microbiol. 46:1146-1151.**
7. **Fontaine, R., M. Cohen, W. Martin, and T. Vernon. 1980. Epidemic salmonellosis from cheddar cheese: surveillance and prevention. Am. J. Epidemiol. 111:247-253.**
8. **Gillespie I. A., O'Brien S. J., Adak G.K., Ward L. R and Smith H. R. 2005. "Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks?" Epidemiol. Infect. 133:795–801**
9. **Greenwood B, Banks T. and Betts S. 1998."Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR" Letters in Applied Microbiology, 26: 437–441**
10. **Greenwood, M., and W. Hooper. 1983. Chocolate bars contaminated with Salmonella napoli: an infective study. Br. Med. J.286:1394.**
11. **Kaplan, M. M., Abdussalam, M. and Bijlenga, G. 1962. In: Milr Hygien, Who Monograph no.42,Geneva.**
12. **Knight, I. T., S. Shults, C. W. Kasper, and R. R. Colwell. 1990. Direct detection of Salmonella spp. in estuaries by using a DNA probe. Appl. Environ. Microbiol. 56:1059-1066.**
13. **Lazcka O., Delcampo, T., Munoz F. X. 2006. "Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosenors" and Bioelectronics. 22(7): 1205-1217.**
14. **Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., and O'Kennedym R. 2003. "Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water. Enzyme and Microbial Technology 32: 3-13**
15. **Lin, C. and Tsen, H. 1996. "Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of Salmonella in foods" Journal of Applied Microbiology, 80: 659–666**
16. **Malone, A. S., Wick C., Shellhammer, T. H. and Courtney P. D. 2003. "High pressure effects on proteolytic and glycolytic enzymes involved in cheese manufacturing" J. Dairy Sci. 86: 1139 – 1146.**

17. Pitcher DG, Fry NK. 2000. "Molecular techniques for the detection and identification of new bacterial pathogens" J Infect. 40(2):116-20.
18. Sharpe, M. E. and Bramley, A. J. 1977. "Dairy Indus" Int., 42(9): 24- 28
19. Shen H. W., Yu RC. And Chou C. 2007. "Acid adaptation affects the viability of *Salmonella typhimurium* during the lactic fermentation of Skin milk and product storade" international journal of food microbiology. 114 (3): 380 – 385.
20. Stevens KA, Jaykus LA. 2004. "Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review" Crit Rev Microbiol. 30(1):7-24
21. Touron A., Berthe T., Pawlak B. and Petit F. 2005 "Detection of *Salmonella* in environmental water and sediment by a nested-multiplex polymerase chain reaction assay" Int J Food Microbiol 156(4):541-553
22. Yaron S, Matthews KR. 2002. "A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli O157:H7*: investigation of specific target genes" J Appl Microbiol.;92(4):633-40
23. سليق، سمير – أبوغرة، صياح. 2007. "دراسة عدد من الصفات الكيميائية والميكروبية لبعض أجبان (الشلل والحلوم) السورية" مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. 23 (1): 169-189.
24. السيد شحاته، عبده. 1997. "تكنولوجيا الجبن–الأسس العلمية" المكتبة الاكاديمية– مصر. 69 – 72.

Received	2012/04/12	إيداع البحث
Accepted for Publ.	2012/07/18	قبول البحث للنشر