تقدير الأحياء المجهرية في منتجات الألبان السائلة Appreciation of microorganisms in liquid dairy products الأسس المعتمدة في إجراء الفحوصات :

طرائق عن الأحياء المجهرية:

إن الحليب ومنتجاته تعد من أكثر الأغذية عرضة للتلوث والتلف بفعل الأحياء المجهرية وتميز منتجات الألبان المختلفة بخصائص تختلف عن بعضها لذلك يجب فهم طبيعة كل مادة وخصائصها ومن ثم كيفية إجراء الفحوص المناسبة لكل منها والتي تعتمد على النقاط ادناه:

: Sampling اخذ العينات -1

- ✓ الحليب السائل الخام: ترج دبات الحليب وتخلط خلطاً جيداً وبعد ذلك يسحب حجم مناسب حوالي 250 مللتر وينقل إلى دورق معقم، أما عينات الحليب التي تؤخذ من ضرع الحيوان مباشرة فيجب غسل وتطهير ضرع الحيوان جيداً وتنشيفه ومن ثم حلب الحيوان وإهمال القطرات الأولى من الحليب والتي تحتوي على أعداد عالية من الأحياء المجهرية، وعليه فان اخذ العينة Sampling أما أن تؤخذ عن كل ربع من أرباع الضرع على إنفراد أو تؤخذ عينة ممثلة من كل ضرع في نفس الدورق.
- ✓ الحليب السائل (المبستر، المعقم): يتم إختيار عدد من العبوات المحكمة الغلق والتاكد من خلوها من التشققات أو الفتحات، علماً إن عدد العبوات المسحوبة يعتمد على حجم أو كمية الوجبة الإنتاجية المطلوب فحصها.
- ✓ منتجات الألبان الأخرى (الجبن ، القشطة ، الزبد ، الأيس كريم): تعامل كل عينة بطريقة خاصة تذكر في حينها تحت فقرة اخذ النموذج (Sampling) الخاص بكل منتج لبنى تجنباً للتكرار .

2- حفظ العينات:

تحفظ جميع عينات الألبان (عدا الحليب المعقم والمركز المحلى والمجفف) في صناديق مثلجة Icebox حاوية على الثلج المجروش بهدف خفض درجة حرارة المنتجات إلى حدود 4 م وابقاءها على هذه الدرجة لحين إجراء أو تطبيق الفحوصات المناسبة على أن لا تطول مدة الحفظ 24 ساعة خوفاً من تغير الأعداد المايكروبية في هذه المنتجات.

3- تحضير الأوساط الزرعية ومحاليل التخفيف المناسبة:

لكل نوع من الفحوصات المايكروبية وسط زرعي متخصص ومحاليل تخفيف مناسبة، لذا يتم تحضير محاليل التخفيف والأوساط الزرعية الملائمة لكل نوع من الفحوصات التي ستجرى للعينات وبالكميات الكافية ويراعي تحضير هذه الأوساط والمحاليل تبعا لتعليمات الشركة المجهزة من حيث التركيز وكيفية التعقيم.

إجراء الفحوصات تحت ظروف مهمة:

تحتاج الفحوصات المايكروبية إلى ثقة متناهية وخبرة وممارسة ، فضلاً عن الخلفية العملية للشخص القائم بها ، لضمان إجراءها تحت ظروف معقمة بحيث لا يحدث تلوث اثناء العمل بمعنى يجب إجراء كافة الفحوصات تحت ظروف معقمة ابتداء من أخذ الوزن أو الحجم المناسب وكذلك تحضير التخافيف والأوساط والزرعية والأطباق ، لذا يجب تعقيم مناضد العمل بمحلول معقم (الكحول ، الديتول) قبل العمل ، ومن ثم تعقيم الأيدي بالكحول ، ويكون العمل قرب اللهب وليس بعيداً عنه مع مراعاة عدم حصول خطا يؤدي إلى التلوث.

4- الحضن بدرجات الحرارة والمدد الزمنية المناسبة:

لكل فحص درجة حرارة خاصة به ووقت خاص أيضاً فمثلاً في حالة تقدير العدد الكلي -32 للأحياء المجهرية الهوائية معتدلة الحرارة Mesophilic يتطلب الحضن بدرجة حرارة 22 37 م لمدة 24 ساعة ، بينما في حالة من البكتريا المحبة للبرودة 24 ساعة المحرارة العالية يتطلب الحضن بدرجة حرارة 7 م لمدة 7 م لمدة 7 م لمدة 8 ساعة ، وفي حالة الخمائر أو الأعفان يكون الحضن بدرجة 8 م وكمعدل 8 م لمدة 8 م لمدة 8 م لمدة 8 م أيام وبعض الفحوصات بتطلب 8 م 8 م أيام.

5- حساب النتائج النهائية:

بعد ظهور النموات في الأطباق أو غيرها يجب معرفة كيفية حساب النتائج واستخراج العدد النهائي للأحياء المجهرية النامية منسوبة لكل غرام أو مللتر من العينة أو وحدة المساحة بالنسبة الفحوصات المسحية (Swab) أو وحدة الحجوم بالنسبة للاجواء (كالهواء المأخوذ من قاعات الإنتاج وغيرها) وأن أي خطأ في هذه المرحلة قد يعرض النتائج إلى التضاعف عشرات المرات.

مميزات هذه الطريقة:

أو رفض المنتجات ومدى صلاحيتها للتسويق ، فعليه أن لا يقبل الخطأ أو التتازل لأنه يتعامل مع أحياء مجهرية ولا سيما أن بعض الأنواع الممرضة منها مثل Salmonella لا يسمح بوجود خلية واحدة منها على الإطلاق ، فإذا لم تعطى النتائج بصورة صحيحة وصادقة فهذا يعني الإستهانة بصحة المستهلك .

الطرائق المعتمدة في عد الأحياء المجهرية للحليب ومنتجاته (DMC) Direct Microscopic Count): 1

يمكن عد الأحياء المجهرية الموجودة في الحليب أو منتجاته أو أية مادة غذائية عداً مباشراً وذلك بوساطة المجهر ، إذ أن هذه الطريقة (الأساس العلمي لها) : تعتمد على فحص حجم معين من نموذج الحليب أو الأغذية السائلة بشكل غشاء تحت المجهر بعد تصبيغه ، ومن

- ✓ سريعة يمكن إنجازها خلال 10 15 دقيقة ، أي أنها تسمح بإعطاء حكم سريع على
 إحتمالية وجود مشاكل في نوعية المنتجات .
 - ✓ تعد كافة المايكروبات الموجودة في العينة قيد الفحص (الحية والميتة) .
- ✓ تعطي إختبار سريع للتلوث البكتيري في الحليب أو القشدة الخام المأخوذة مباشرة من المنتج.
 - ✓ تعتمد دقة الطريقة بشكل فعال على تأهيل القائمين بها وكثرة إستعمالهم لها .
- ✓ إن هذه الطريقة مباشرة ، وذلك لأن القائم بها يعد الخلايا بشكل مباشر تحت المجهر حتى وان كانت بشكل تكتلات فهي تعد خلية واحدة ، في حين الطريقة غير المباشرة وهي طريقة العد بالأطباق والتي ستذكر لاحقاً ، إذ أن كل مستعمرة يتم عدها تكون ناتجة من نمو وتكاثر خلية واحدة والتي تعرف بمصطلح Viable cell .

خطوات طريقة DMC:

: (MF) Microscopic Factor حساب المعامل المجهري

- يتم ذلك عن طريق قياس قطر العدسة الزينية للمجهر المعتمد في فحص العينة ، وذلك بوساطة شريحة مأيكرومترية Stage Micrometer .
- - معامل المجهر = 100/ مساحة الحقل المجهري (ملم).

إذ أن قيمة MF (والتي تكون بدون وحدات) تشير إلى عدد الحقول المجهرية الموجودة في مساحة 1 سم 2 .

حد الحثول الواچب حسابها	حدد البكثريا في الحقل الواحد
50	أقل من 0.5
25	0.5 الى 1
10	1 الى 10
5	10 الى 30
يخفف ويعاد الفحص	أكثر من 30

- يُحضر النموذج وذلك باتباع ما يلي:
- ينشر حجم (0.01) مللتر من النموذج بوساطة ماصة دقيقة أو Loop قياسي على شريحة دجاجية خاصة تسمى شريحة Breed مثبت عليها مساحة (1 mas^2) ومن ثم يجفف بالهواء .
- تغطي الشريحة بالزأيلين Xylene أو الأسيتون، ومن ثم بالكحول الأثيلي لإذابة المحتويات الدهنية للحليب التي قد تؤثر على إجراء الفحص
- تصبغ الشريحة تصبيغاً بسيطاً أما بإستعمال صبغة Crystal violet أو تصبيغاً بسيطاً أما بإستعمال صبغة Blue (لمدة 3 دقائق) ثم تجفف بالهواء بعد غسلها .
- لغرض العد المباشر توضع الشريحة تحت المجهر (أي تحت العدسة الزيتية بعد تحديد الحقل المجهري من خلال العدسة الصغرى) ويعد عشوائياً عدد من الحقول المجهرية (10 50) حقل مجهري ويعتمد ذلك على عدد البكتريا في الحقل الواحد ، وكما موضح في الجدول أعلاه.
 - يستخرج عدد الخلايا أو معدل عدد الخلايا في الحقل الواحد والمعبر عنها بقيمة N :

$$N = \frac{1}{2} \frac{1}{2}$$

مالتر وذلك بتطبيق المعادلة – يستخرج العدد النهائي للخلايا والذي يعبر عنه بـ $CFU \, / \, ML = MF \times N$

ملاحظة: في حالة تخفيف النموذج (أي عندما يكون عدد الخلايا في الحقل الواحد أكثر من 25 خلية عندها يخفف النموذج بإستعمال سائل التخفيف المناسب)، وعليه فإن القانون الأخير يضرب في معاملة التخفيف.

، الواحد مللتر .	البكتريا في	خلال عدد	الحليب من	يوضىح نوعية	والجدول التالي
------------------	-------------	----------	-----------	-------------	----------------

الثوصية البكثيرية في الحليب	حدد البكثريا في المثلثر الواحد
ختر	10^5 خن من 5
ضعيف	10 ⁶ ×4 الى 10 ⁵ ×5
رديء	$10^7 \times 2$ الى $10^6 \times 4$
رديء جدًا	10^7 ×2 أكثر من

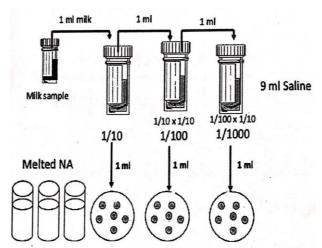
2 . العد بالأطباق القياسية Standard Plate Count . 2

تعد من الطرق غير المباشرة Indirect المعتمدة بشكل روتيني في عد الأحياء المجهرية للأغذية، كما أنها تستعمل لعد الأحياء المجهرية في الحليب ومنتجاته ، وأساس هذه الطريقة : انها تعتمد على زرع النماذج المراد فحصها في وسط زرعي مناسب (بعد إجراء التخافيف العشرية) ومن ثم الحضن بدرجة حرارة مناسبة يليها عدد المستعمرات النامية بعد ان تضرب في مقلوب التخفيف ، ومن مميزات هذه الطريقة إنها تعد الخلايا الحية فقط وتتطلب وقت ومعدات أو مستلزمات عمل كثيرة ويمكن اعتمادها كطريقة مناسبة لمعظم منتجات الالبان.

خطوات طريقة العد بالأطباق القياسية SPC:

أ_ تمزج عينة الحليب جيدًا (ترج 25 مرة) ثم ينقل منها 10 مللتر من نموذج الحليب إلى قنينة تخفيف تحتوي على 90 مللتر من سائل التخفيف مثل ماء البيتون Paptone water للحصول على تخفيف 10 / 1 ومن ثم تحضر باقي التخافيف بنفس الطريقة لحين الوصول إلى التخفيف المطلوب .

ب_ ينقل 1 مللتر من كل تخفيف إلى طبق فارغ معقم (وبواقع مكررين) ثم يضاف إليه من 25 - 15 مللتر من الوسط الزرعي المناسب مثل Nutrient Agar أو دروج الموذج مع الوسط ثم يترك ليتصلب بدرجة حرارة الغرفة.



كلية الزراعة / جامعة الأنبار المرحلـــة الثالثة المرحلـــة الثالثة المحتبر الأول المختبر الأول

ج_ تحضن الأطباق (بصورة مقلوبة) بدرجة حرارة 32 - 37 م لمدة 48 ساعة (ويفضل في منتجات الألبان أن يكون الحضن بدرجة حرارة 32 م لمدة 48 ساعة العدد الكلي للبكتريا الهوائية حتى يُسمح للمستعمرات أن تأخذ حجمها الطبيعي ويمكن رؤيتها بسهولة.