دراسة الأحياء المجهرية الإبتدائية في الحليب الخام

Initial microflora of raw milk

ان مصطلح Microflora يعنى الأحياء المجهرية الإبتدائية في الحليب (إبتدائي Flora)، وهنالك ظروف كثيرة تدخل في تواجدها سواء من الأجهزة و المعدات، فمن المعلوم إن الحليب الخام يصنع بعد أن يبستر أو يعقم ثم يستهلك ، وتوجد أجناس مختلفة من البكتريا في الحليب الخام ، إن أعداد وأنواع الأحياء المجهرية بعد الإنتاج مباشرة تعكس مدى التلوث الميكروبي خلال الإنتاج ، وعليه فان الأحياء الإبتدائية تحدد بدرجة الحرارة التي يبرد عندها الحليب الخام فعند تبريد الحليب وخزنه على درجة 4 مئوية أو أقل فانها (أي هذه الدرجة) تعمل على منع تكاثر البكتريا على أقل تقدير لفترة 24 ساعة.

عند إستلام نموذج الحليب الخام فمن أهم الأمور التي يتطلب دراستها من أجل تقييم أو إعطاء صورة عن هذا النموذج كالاتي:

هناك ما يسمى ب General viable count العدد العام للأحياء المجهرية حيث يستخدم وسط زرعي، ملائم لمعرفة كل الأحياء المجهرية وان تتواجد باعداد مسموح بها وعند تجاوز هذه الأعداد من الحد المسموح به يجب إعادة النظر في عمليات الحلب و ظروف الإنتاج.

من البكتريا الأخرى التي تعد دليلا و مؤشرا على الظروف الصحية والصحيحة التي جمع فيها الحليب و التي تقع تحت مصطلح Hygiene or Sanitation هي بكتريا القولون Coliform وعلى وجه الخصوص البرازية (Fecal) كذلك يتم الكشف عن البكتريا المكونة للأبواغ Spore Forming وعلى وجه التحديد بكتريا Bacillus وأنواعها كما يتم الكشف عن البكتريا المحللة للبروتين Proteolytic و البكتريا المطلة للدهون Lipolytic.

أولًا : الكشف عن البكتريا المكونة للأبواغ (Spore Forming bacteria) في الحليب الخام :

تعد من البكتريا التي تنفرد في كونها مقاومة الحرارة والظروف المتطرفة عن باقي أنواع الأحياء المجهرية بمعنى أنها تتحمل حرارة أعلى من الأنواع الأخرى. ولأجل حساب البكتريا المكونة الأبواغ (Spore Forming) في نموذج حليب نتبع الخطوات الأتية :

1- يسحب 5-10 مللتر من الحليب الخام ويوضع في أنبوبة زجاجية نظيفة وومعقمة (تستعمل أنبوبتين الأولى للفحص و الثانية يوضع فيها محرار لقياس درجة الحرارة)، ومما تجدر الإشارة إليه يجب أن يكون العمل تحت ظروف معقمة Ascoptic Technique بمعنى استخدام أنابيب معقمة للتعرف على الأحياء المجهرية الموجودة في الحليب فقط.

2- تسخن الأنابيب إلى درجة حرارة 80م لمدة 10 دقائق (أي تحسب المدة الزمنية عند الوصول لهذه الدرجة) ثم تنقل الأنابيب إلى حمام ثلجي لغرض تبريدها.

3- ينقل حجم معين من النموذج المبرد (وبالامكان إجراء تخافيف للعينه بعد تبريدها) إلى

اطباق معقمة بواقع مكررين ثم يصب الوسط الزراعى (Starch milk agar) الذي يحضر مختبريًا من المكونات الأتية :

Nutrient Agar **100** ml
Skim Milk **1** ml
Soluble Starch (**10%**) **1** ml

إن الهدف من إضافة النشا في هذا الوسط كون النشأ يمتص المواد التي تثبط Inhibition نمو أو إنبات الأبواغ فتعمل على إعاقة تحول الأبواغ إلى خلايا خضرية ومن هذه المواد: الحوامض الدهنية غير المشبعة والتي قد تكون موجودة في الوسط فيعمل النشا على إمتصاصها .

ثانيًا : الكشف عن البكتريا المقاومة للحرارة (Thermoduric Bacteria)

1- يسحب من 5-10 مللتر من الحليب الخام ويوضع في أنبوبة زجاجية نظيفة ومعقمة (تستعمل انبوبتين الأولى للفحص والثانية يوضع فيها محرار لقياس درجة الحرارة) .

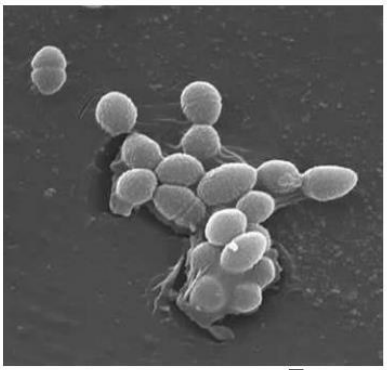
2- يسخن النموذج إلى درجة حرارة 60 م لمدة نصف ساعة حيث بحسب الوقت عند الوصول لهذه الدرجة .

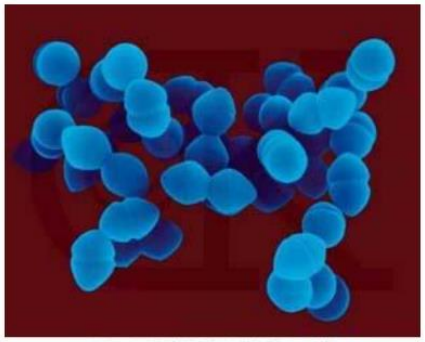
3- تُبرد الأنابيب مباشرة وتُجرى التخافيف اللازمة للنموذج ثم ينتقل حجم معين (1 مللتر) من كل تخفيف إلى الأطباق المعقمة ويضاف الوسط الزرعي Nutrient Agar أو الوسط الزرعي Plate count Agar وتحضن الأطباق بعد تصلب الوسط في درجات حرارية ووقت مختلف.

إن الوسط الزرعي العام هو Nutrient Agar وهو نفس مكونات الوسط Plate Cout Agar ما عدا أن الأخير يحتوي على سكر الكلوكوز فضلا عن المكونات الأخرى لوسط Nutrient Agar .

Thermoduric bacteria

- able to survive pasteurization temperature treatment.
  - Include some species from *Micrococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus*, *Bacillus* (spores) and *Clostridium* (spores).



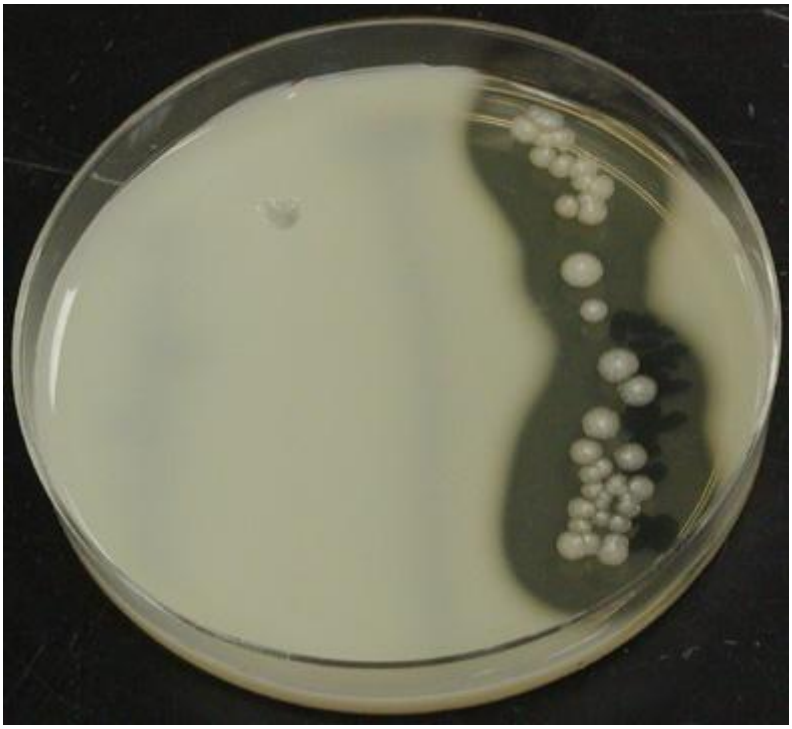


Copyright Dennis Kunkel

Enterococcus

ثالثًا : الكشف عن البكتريا المحللة للبروتين Proteolytic Bacteria

تعمل البكتريا المحللة للبروتين على بروتين الحليب هو الكازين الذي يعطي اللون الأبيض والمعتم للحليب والذي يكون بشكل غروي في الحليب وعند تحلله بفعل الأنزيمات المحللة للبروتين proteases يتحول الكازين إلى مركبات ذائبة فيفقد اللون الأبيض المعتم أي يتحول إلى هالة شفافة



ويتم الكشف عن هذا النوع من البكتريا باتباع الخطوات الأتية:

1- تجرى التخفيف لعينة الحليب المراد فحصها.

2- ينقل 1 مللتر من كل تخفيف ويضاف الوسط الزرعي Milk Agar (المحضر من 10% من الحليب الفرز Skim Milk المضاف إلى الوسط الزرعي المغذي Nutrient Agar .

3- توضع النماذج في الحاضنة بدرجة حرارة 7م وأخرى بدرجة حرارة 32م (7م: لغرض نمو البكتريا المقاومة للبرودة Psychotropic و 32م: لغرض نمو بكتريا المحبة لدرجات الحرارة المتوسطة Mesophilic).

والنتيجة الموجبة تكون بظهور هالة شفافة Clear Zone تحيط بالمستعمرات النامية مما يدل على وجود البكتريا المنتجة للانزيمات المحللة للبروتين.

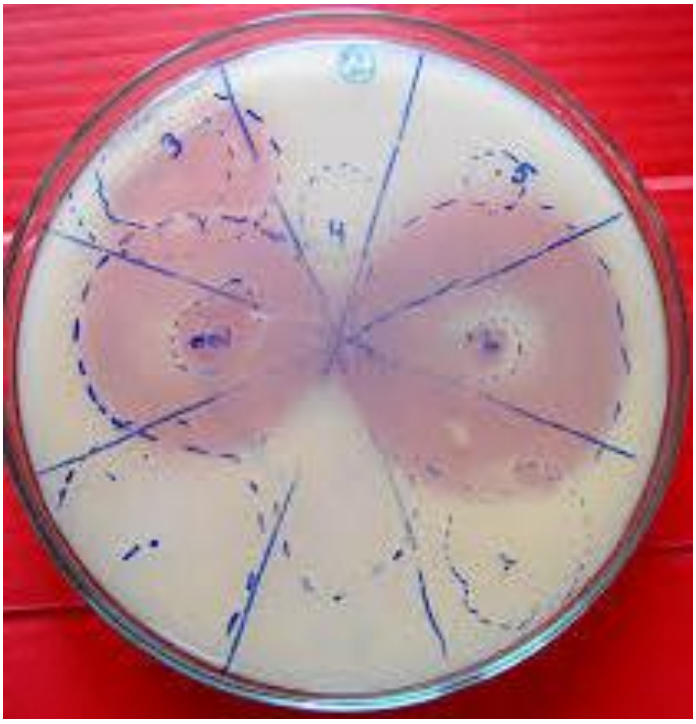
رابعًا: الكشف عن البكتريا المحللة للدهون Lipolytic Bacteria

ويتم الكشف عنها بإستعمال الوسط الزرعي Tributyrin Agar ويتكون من :

Peptone **5** gm
Yeast extract **3** gm

Agar **12 gm**

والتي تذاب في لتر من الماء المقطر وتعقم في المؤصدة وتبرد إلى درجة حرارة 80 م وتخلط مع 10 غم من Tributyrin ثم تصب على النمازج المحضرة كما في الفقرة السابقة وتحضن على درجة حرارة 32م ويمكن الإستدلال عن النتيجة الموجبة بظهور هالة شفافة تحيط بالمستعمرة نتيجة تحلل الدهون من قبل البكتريا المنتجة للأنزيمات المحللة للدهون.

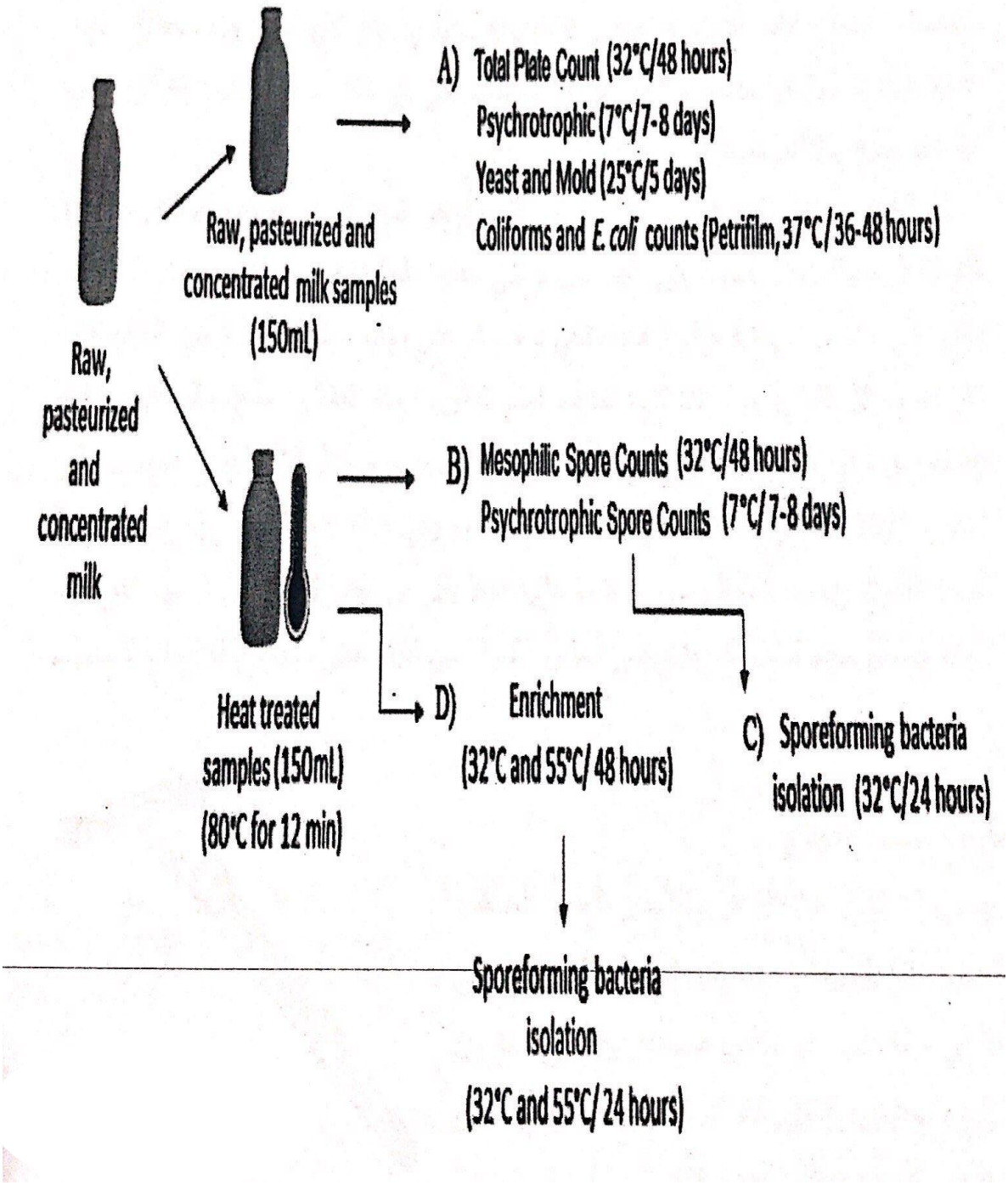


خامسًا : الكشف عن مجموعة بكتريا القولون Coliform bacteria:

يتم باستعمال أحد الأوساط الزرعية Violet Red Bile Agar أو الوسط الزرعي MacConikey Agar ومن ثم الحضن بدرجة حرارة 37م لمدة 48 ساعة .

ملاحظات هامة:

أن مصطلح General Viable Count يعني حساب الخلايا التي لها القدرة أو القابلية على الإنقسام فقد تكون الخلية حية لكن ليس لها القدرة على النمو والتكاثر أما عند تطبيق طريقة العد المباشرة DMC فانه يتم حساب العدد الكلي Total count ، أي تحسب الخلايا الحية والميتة على السواء، وعند تطبيق طريقة العد بالأطباق القياسية SPC (غير المباشرة) لغرض حساب General Viable يستعمل الوسط الزرعي Plate count Agar بعد إجراء التخافيق اللازمة ويتم الحضن حسب نوع البكتريا المراد الكشف عنها أي يمكن معرفة كل نوع على ضوء درجة حرارة الحضن .


A) Total Plate Count (32°C/48 hours)
Psychrotrophic (7°C/7-8 days)
Yeast and Mold (25°C/5 days)
Coliforms and E. coli counts (Petrifilm, 37°C/36-48 hours)
Raw, pasteurized and concentrated milk samples (150mL)
Raw, pasteurized and concentrated milk
B) Mesophilic Spore Counts (32°C/48 hours)
Psychrotrophic Spore Counts (7°C/7-8 days)
Heat treated samples (150mL) (80°C for 12 min)
D) Enrichment (32°C and 55°C/48 hours)
C) Sporeforming bacteria isolation (32°C/24 hours)
Sporeforming bacteria isolation (32°C and 55°C/24 hours)