المحاضرة الخامسة – الفحوصات البكتريولوجية للحليب

يعتبر الحليب بيئة مناسبة جداً لتكاثر ونشاط الميكروبات عامة بما في ذلك البكتريا المرضية وان الكثير من الميكروبات الجرثومية لها القدرة على النمو في الحليب مع احداث الكثير من التغيرات غير المرغوبة في الطعم والرائحة واللون والتي تسبب فساد الحليب ، ولذا فان دراسة ميكروبيولوجية الحليب هدفها التأكد من خلوه من البكتريا المرضية بالإضافة الى زيادة فترة حفظ الحليب .

اولاً : اختبار المثيلين الازرق Methylene blue test :

يعتبر هذا الفحص طريقة سريعة وغير مباشرة تعطي فكرة تقريبية عن المحتوى البكتريولوجي للحليب وبالتالي درجة جودته ودرجة النظافة المتبعة في انتاجه ، حيث ان هناك علاقة ما بين الوقت الذي يختزل فيه المثيلين الازرق وبين محتويات الحليب البكتريولوجية .

يعتمد هذا الاختبار اساساً على ان البكتريا تستخدم اثناء نموها الاوكسجين الموجود في الحليب على حالة حرة وبذلك تتغير ظروف الحليب من حالة الاكسدة المعتدلة الى حالة الاختزال ، ويتوقف سرعة هذا التغير على عدد البكتريا في الحليب ومعدل نموها ومقدرتها على استهلاك الاوكسجين الحر الموجود في الحليب ، يمكن معرفة عدد البكتريا الموجودة في الحليب بصورة تقريبية وذلك من معرفة الوقت الذي يحدث عنده هذا التغير ، وان صبغة المثيلين الازرق يكون لونها ازرق عندما تكون تحت ظروف مؤكسدة ، او في حالة الاكسدة وتصبح عديمة اللون عندما تختزل ولهذا يمكن استخدامها كدليل لمعرفة حدوث هذا التغير في الحليب أي تحويله من حالة الاكسدة الى الاختزال .

عيوب الاختبار : يعتمد هذا الاختبار على استهلاك الاوكسجين الحر في الحليب نتيجة نمو البكتريا الموجودة في الحليب حتى يصل الاوكسجين في الحليب الى حد معين تختزل عنده ازرق المثيلين

ومن الصعب معرفة عدد البكتريا الموجودة في الحليب بواسطة هذا الاختبار لعدة اسباب أهمها :

1- تختلف البكتريا الموجودة في الحليب من حيث معدل نموها .
2- الاختلاف في معدل استهلاك الاوكسجين بواسطة البكتريا الموجودة في الحليب .
3- عدم تجانس توزيع البكتريا الموجودة في الحليب حيث ان طبقة الكريم تحجز جزء كبير من البكتريا الموجودة في الحليب .
4- الاختلاف في كمية الاوكسجين الذائب في الحليب حيث يتأثر بدرجة الحرارة ودرجة التقليب التي يتعرض لها الحليب قبل الاختبار مباشرة .
5- وجود بعض العوامل المختزلة في الحليب اولها القدرة على اختزال ازرق المثيلين ومن هذه العوامل المختزلة كريات الدم البيضاء وبعض الانزيمات وايضاً بعض مكونات الحليب.

مميزات اختبار المثيلين الأزرق :

1- بساطته وسهولته .
2- يحتاج الى عدد قليل من الادوات مثل انابيب الاختبار وحمام مائي .
3- كما انه يمتاز بالسرعة وتحديد جودة الحليب .

	درجة الحليب	وقت إختزال الصبغة
1	حليب ممتاز	لا يختزل اللون في 8 ساعات
2	حليب جيد	يختزل اللون في أقل من 8 ساعات وأكثر من 6 ساعات
3	حليب متوسط	يختزل اللون في أقل من 6 ساعات وأكثر من ساعتين
4	حليب رديء	يختزل اللون في أقل من ساعتين

طريقة العمل :

1- امزج جيدا عينة من الحليب بقلب الزجاجة عدة مرات .
2- بواسطة ماصة معقمة انقل (10) مل من الحليب الى انبوبة اختبار معقمة .
3- اضف الى الانبوبة (1) مل من محلول ازرق المثيلين .
4- استبدل السدادة القطنية بأخرى مطاطية معقمة ثم سجل المعلومات على الانبوبة واقلبها عدة مرات لمزج الصبغة مع الحليب .
5- سجل الوقت ثم ضع الانابيب في حمام مائي على درجة (37) م بحيث يكون سطح الماء في الحمام المائي اعلى من سطح الحليب في الانابيب .
6- لاحظ الانابيب في الحمام المائي كل نصف ساعة وسجل الوقت الذي يزول عنده لون الصبغة وقلب الانابيب التي يتم اختزالها بقلبها مرة أخرى .
7- لسهولة التمييز بين الانابيب التي لم يتم اختزالها أي لم يتغير لونها او تغير جزئيا او زال لونها توضع معها في الحمام المائي انبوبة المقارنة التي تحتوي على (10) مل من خليط عينات الحليب التي يجرى عليها الاختبار على ان تغمر هذه الانبوبة في ماء مغلي لبضع دقائق لا يقاف فعل العوامل التي تسبب اختزال اللون ثم يضاف (1) مل من محلول ازرق المثيلين .

ملاحظة : ان الوقت الذي يختزل فيه لون المثيلين الازرق يتناسب عكسياً مع العدد الكلي للبكتريا في الحليب فكلما كان عدد البكتريا كبيرا (حليب رديء) كلما كانت المدة لاختزال المثيلين الازرق الى المثيلين عديم اللون قصيرة وكما مبين في نماذج الحليب أدناه .

الفرق بين نماذج الحليب في اختزال صبغة المثيلين الأزرق

ثانياً : اختبار الريزازورين Resazurin Test :

استخدم هذا الاختبار في المانيا سنة 1928 كطريقة بسيطة وسريعة لتدريج وتقييم درجة جودة الحليب وكما في اختبار ازرق المثيلين فانه يعتمد على اختزال لون الصبغة الى مركب عديم اللون بفعل عوامل اختزال اللون الموجودة بالحليب، ويرجع النظام المختزل اصلا الى نشاط البكتريا الا انه توجد نظم مختزلة اخرى مثل تلك التي تنتج بواسطة الخلايا البيضاء وغيرها من الخلايا الجسمية فهي تؤثر على اختزال الصبغة ولكن بدرجة اقل نشاط، ولقد ادخلت على الاختبار الاصلي الكثير من التعديلات مثل التعديل المعروف باختبار الريزازورين لعشرة دقائق 10 Minutes Resazurin Test .

نظرية الاختبار :

1- تجرى نفس الخطوات في اختبار المثيلين الازرق 1 و 2 و 3 و 4 و 5 .
2- بعد 10 دقائق ارفع الانبوبة من الحمام وقدر لون الحليب بها باستخدام صندوق مقارنة الألوان والقرص الخاص بالريزازورين مع المقارنة بأنبوبة بها نفس الكمية من الحليب بدون دليل

ويلاحظ ان درجة جودة الحليب يمكن الحكم عليها بهذا الاختبار على اساس الجدول التالي :

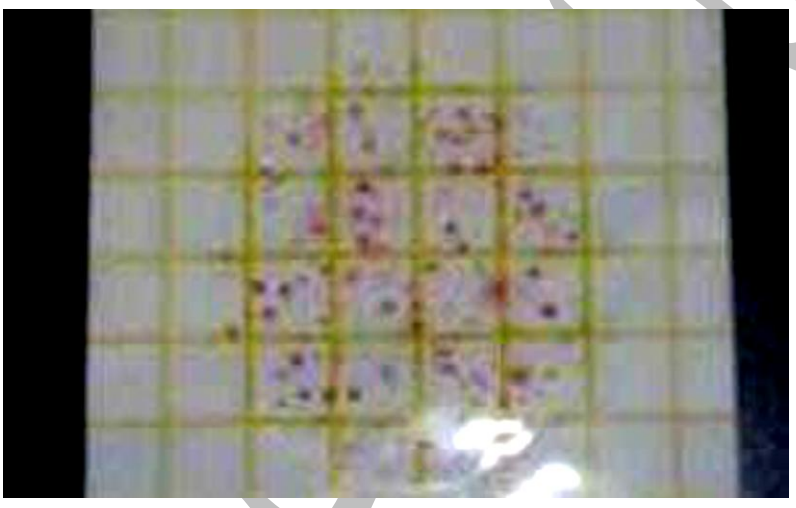
اللون بعد 10د على درجة 37 درجة سليزية	الرقم على القرص	درجة جودة الحليب
أزرق	6	ممتاز
بنفسجي فاتح	5	جيد جدا
بنفسجي براق	4	جيد
وردي مائل للبنفسجي	3	متوسط
بنفسجي مائل للوردي	2	غير مقبول
وردي	1	رديء
عديم اللون	0	مرفوض

تدرج الوان الحليب بعد إختزال صبغة الريزازورين وحسب درجة تلوث الحليب

ثالثاً : العد المباشر بالمايكروسكوب Direct Microscope Count :

تدعى بطريقة بريد Breed method وهي طريقة سريعة تجرى بأخذ حجم معين قطرة صغيرة من الحليب ووضعه على شريحة مجهرية خاصة تكون مقسمة إلى مربعات معلومة البعد والمساحة (شريحة عد كريات الدم الحمر) ثم تصبغ هذه القطرة بصبغة المثلين الأزرق على الشريحة ثم تفحص تحت المجهر ، ومن حساب معدل عدد البكتريا في المربع الواحد وضرب هذه القيمة في المعامل المجهري ، يمكننا الحصول على عدد البكتريا في ملم^3 الواحد من العينة ، وفي حالة العينات المخففة تضرب هذه القيمة بمقلوب نسبة التخفيف **ومن مساوئ** هذه الطريقة لا يمكن التمييز بين الخلايا الحية والخلايا الميتة في العينة المفحوصة.

$$\text{عدد البكتريا / مل} = \frac{\text{عدد البكتريا المحسوبة في الحقول}}{\text{عدد الحقول}} \times 20000 \times \text{مقلوب التخفيف}$$



الميكروبات على شريحة عد كريات الدم الحمر تحت المجهر

رابعاً : العد الميكروبي غير المباشر Indirect Microbial Count : ويكون على طريقتين

A - طريقة العد بالأطباق المصبوبة Pour Plate method :

1- عمل التخفيفات ويكون بأخذ 1 مل من عينة الحليب بواسطة ماصة واضافتها الى 10 مل ماء معقم ونرجها جيداً وبذلك نحصل على تخفيف 1×10^{-1} ثم باستعمال الماصة أنقل 1 مل من التخفيف السابق إلى انبوبة اخرى تحوي 9 مل ماء معقم للحصول على تخفيف 1×10^{-2} وهكذا يستمر عمل التخفيف وحسب التلوث المتوقع للعينة وكما مبين بالشكل أدناه .

2- يحضر ثلاث أطباق معقمة لكل عينة أو تخفيف ، ثم يرفع غطاء الطبق من أحد الجوانب بأقل فتحة ممكنة وفي ظروف معقمة وينقل إليه بواسطة ماصة معقمة 1 مل من العينة ، وكذلك من التخفيفات .

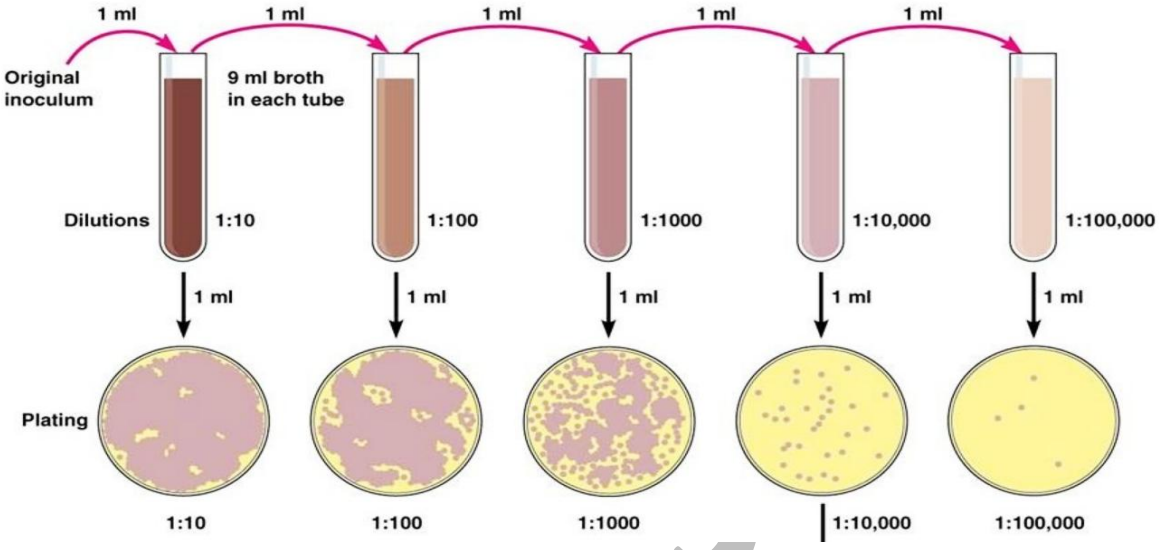
3- يرفع غطاء الطبق مرة أخرى ويصب فيه 20- 15 مل من الوسط الغذائي المعقم وتكون درجة حرارته 44 - 46 م^0 .

4- تخلط محتويات الطبق جيدا وذلك بتحريك الطبق حركة رحوية ، ثم تترك الأطباق لتتصلب .

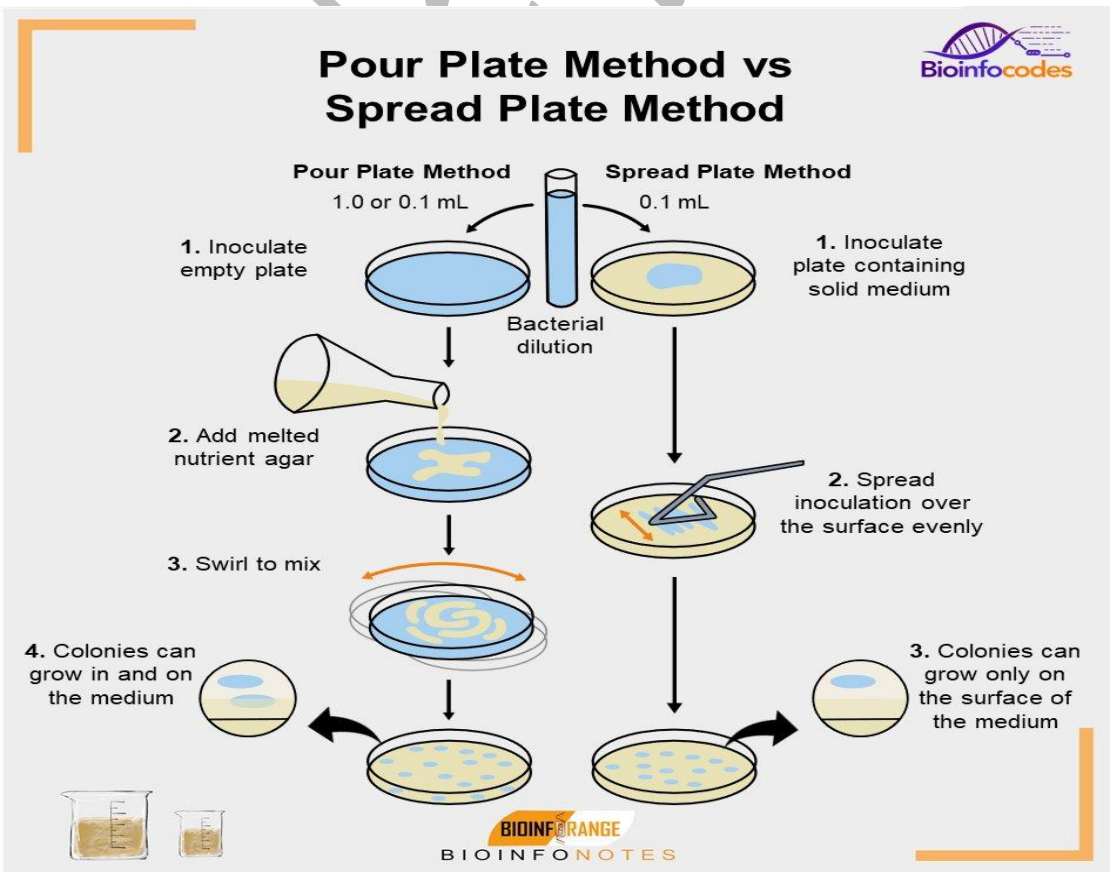
5- تحضن الأطباق بشكل مقلوب بدرجة حرارة 35-37 م^0 لمدة 24 ساعة وعند عدم وجود نمو تزود مدة الحضانة 24 ساعة أخرى للتأكد من النتائج ثم تعد المستعمرات وتضرب في عدد التخفيف .

B- طريقة النشر (الوسط المتصلب) Spread Plate Method :

يزرع (1 مل) من العينة المزروعة الأصلية أو المخففة في بالماء المعقم موضوع في طبق بتري معقم بواقع ثلاث أطباق لكل تخفيف (التخفيف مشابه للطريقة أعلاه العد بالأطباق) وتتم عملية الزرع بوضع (1 مل) وينشر على الوسط بواسطة swab أو ناشر معدني معقم وتراعى وجود الظروف المعقمة ، ثم تحضن المزارع بدرجة حرارة 35-37 م^0 لمدة 24 ساعة ثم تحسب عدد المستعمرات النامية والذي يمثل عدد البكتريا الموجودة في (1 مل) من العينة المدروسة.



العدد الميكروبي في الاطباق (نلاحظ انخفاض العدد الميكروبي بزيادة نسبة التخفيف)



مقارنة بين طريقة العد بالأطباق وطريقة النشر على الوسط