Mesopotamia J. of Agric. ISSN: 2224 - 9796 (Online) مجلــة زراعــة الـرافـديـن
Vol. (46) No. (4) 2018 ISSN: 1815 - 316 X (Print) المجلد (46) العدد (4) 2018

مقارنة الطرق الميكروبية المستخدمة في الحكم على نوعية الحليب

خزعل شعبان عبد الله غانم محمود حسن
قسم علوم الأغذية - كلية الزراعة والغابات- جامعة الموصل العراق
E-mail:Dralabbasi58@yahoo.com

الخلاصة

من الطرق المستخدمة في الحكم على جودة الحليب طريقة العد الميكروسكوبي المباشر وهذه الطريقة سريعة ويمكن تمييز اشكال الخلايا وتحديد مصدر التلوث الميكروبي، لكن من الصعوبة التمييز بين الخلايا الحية والميتة ولهذا فانها لا تعطي نتائج مقبولة بالنسبة للحليب المعامل بالحرارة العالية.
كانت النتائج في طريقة الاطباق المصبوبة القياسية مقبولة على الرغم من انها تعتبر طريقة بطيئة الا انها تحسب اعداد الخلايا الحية فقط اذ تراوحت هذه الاعداد من 15×410 و.ت.م/مل الى 17×10 5 و.ت.م/مل في الحليب بعد البسترة مباشرة ويلاحظ بان اعداد البكتريا فيها اقل من ما في طريقة العد الميكروسكوبي المباشر اذ تراوحت اعداد البكتريا من 35×510 و.ت.م/مل الى 150×10 5 و.ت.م/مل بعد عملية البسترة مباشرة وازدادت هذه الاعداد مع زيادة فترة الخزن في كلا الطريقتين في حين ان طريقة استخدام اختزال الصبغات اعطت نتائج غير مقبولة نتيجة للتلوث السريع في الحليب اذ قسمت عينات الحليب الى مجموعتين الأولى كانت اعداد البكتريا التي تم تقديرها بطريقة الاطباق المصبوبة اقل من 50×10 3و.ت.م/مل والثانية كانت اعداد البكتريا فيها اكثر من 50×10 3 و.ت.م/مل فوجد بان عينات الحليب التي كانت فيها اعداد البكتريا اقل من 50×10 3 و.ت.م/مل احتاجت الى وقت أطول لاختزال الصبغات من تلك التي كانت فيها اعداد البكتريا اكثر من 50×10 3 و.ت.م/مل ومع تقدم فترة الخزن قلت الفترة الزمنية لاختزال الصبغات في كلا المجموعتين.

الكلمات المفتاحية:- العد الميكروسكوبي المباشر – الريزازورين – اختزال الصبغات – الاطباق المصبوبة.

تاريخ تسلم البحث: وقبوله

المقدمة

هناك طرق مكروبيولوجية تستخدم لتقدير درجة جودة الحليب وهي اما طرق مباشرة مثل العد البكتيري الميكروسكوبي المباشر او عد البكتريا غير المباشر منها طريقة الاطباق المصبوبة القياسية اذ تعد طريقة العد القياسي بالاطباق من اقدم الطرق وأكثرها استعمالا في تحديد اعداد البكتريا الموجودة في المادة الغذائية بشكل حقيقي (FDA،2001)، وكذلك استخدام الصبغات التي يتغير لونها حسب جهد الاكسدة والاختزال وهي ازرق المثيلين والريزازورين والنترات وهي من الطرق البسيطة للحكم على جودة الحليب وذلك باخذ نماذج عديدة خلال وقت قصير وباستخدام كميات قليلة من الحليب اذ ان الاحياء المجهرية تستهلك الاوكسجين في عملياتها الحيوية المختلفة مما يؤدي الى خفض جهد الاكسدة والاختزال وبالتالي الى تغيير لون الصبغة (Zeng و Escobar) 1996 وعليه كلما زادت اعداد البكتريا في الحليب قل الوقت اللازم لاختزال الصبغة , وهناك عوامل تحدد من استخدامها منها درجة الحرارة المستخدمة فقد لا تلائم البكتريا المحبة لدرجات الحرارة العالية او المحبة للبرودة (Zweifel واخرون، 2005) . تختلف قابلية الاحياء المختلفة على اختزال الصبغات فهناك انواع سريعة مما يؤدي الى ان يظهر وكأنه يحتوي على اعداد هائلة من البكتريا وايضا وجود مواد مانعة لنمو البكتريا في الحليب مثل اللاكتنين واللاكتوفرين وبروتينات المناعة ولكل هذه الاسباب فان طريقة الاطباق المصبوبة القياسية تظهر اعداد البكتريا اكثر من طريقة اختزال الصبغات Murphy وBoor (2000) لكن في بعض الحالات يفضل استخدام طريقة اختزال الصبغات اذ ان هناك انواع من البكتريا تقوم بفعاليات في الحليب لكن لا تستطيع تكوين مستعمرات على الوسط الغذائي وايضا التجمعات البكتيرية clumps تكون على شكل مستعمرة واحدة على الطبق بينما طريقة اختزال الصبغات فان كل بكتريا في التجمع تشترك في اختزال الصبغة.
لذلك هدفت الدراسة الى استخدام الطريقة البسيطة للحكم على جودة الحليب المبستر ومعرفة ايهم افضل من حيث الاسرع في الوقت وكذلك من حيث السهولة والاحتياج للخبرة والاجهزة والمواد

مواد وطرق البحث

اجري البحث في قسم علوم الأغذية للعام 2014 اذ اخذت(30)عينة من الحليب الخام من حقول ابقار كلية الزراعة والغابات /جامعة الموصل وعوملت بالبسترة البطيئة 63مْ لمدة نصف ساعة وبرد الحليب المبستر

وحفظ في عبوات معقمة محكمة الغلق وخزن على درجة حرارة الثلاجة لمدة (72,48,24) ساعة وتم اجراء الاختبارات التالية:-

1- عد البكتريا بطريقة الاطباق المصبوبة:- تم تقدير العدد الكلي للبكتريا في الحليب المبستر باتباع الطريقة المذكورة في FDA(2001) باستخدام طريقة الاطباق المصبوبة مستخدما الوسط الغذائي Tryptone Glucose Yeast extract agar. اذ اضيف 1مل من الحليب المراد فحصه وخفف عشرة اضعاف باستخدام محلول التخفيف الفسيولوجي المحضر من اذابة 8.5 غم من ملح الطعام في لتر من الماء المقطر والذي تم توزيعه في انابيب اختبار بمقدار 9مل والتي تم تعقيمها في جهاز الاوتوكليف على 121م° ولمدة 15 دقيقة والمبردة اذ اضيف 1مل من التخافيف الملائمة (310 ، 410 ، 510) في اطباق بتري معقمة وبواقع مكررين لكل تخفيف ثم صب الوسط الغذائي المبرد على حرارة 45م° وتركت الاطباق لتتصلب ثم حضنت على درجة حرارة 30م° لمدة 48ساعة وعدت المستعمرات في الاطباق الحاوية على (30-300)مستعمرة وحسب العدد الكلي للبكتريا في 1مل من الحليب.

2- طريقة العد الميكروسكوبي المباشر:- تم تقدير العدد الكلي للبكتريا في الحليب المبستر بطريقة العد الميكروسكوبي المباشر باتباع طريقة Collee واخرون(1996) وذلك باخذ حجم معين من الحليب ونشرها على شريحة زجاجية خاصة وتوزع على مساحة 1سم2 ويجفف الغشاء ويصبغ بصبغة كرام (صبغة الجنسيان ثم اليود والغسل بالكحول ثم إضافة صبغة السفرانين) وتفحص تحت المجهر وتحسب عدد الخلايا في الحقل ويحسب عدد الخلايا في 1مل من الحليب.

3- اختزال الصبغات (صبغة ازرق المثيلين والريزازورين) حسب طريقة Graham´ (1980) ينقل (10 مل) من الحليب الى انبوبة اختبار معقمة ذات سداد مطاطي ويضاف لها (1مل) من صبغة Methylene blue وتمزج جيدا بقلب الانبوبة بهدوء ويجب التأكد من عدم وجود فقاعات غازية حتى لا تتأكسد الصبغة. تحضن الانبوبة في حمام مائي وتفحص كل نصف ساعة لمدة 6 ساعات. وكلما زادت سرعة الاختزال فان ذلك يعني احتواء الحليب على اعداد اكبر من البكتيريا.

4- اختزال النترات حسب طريقة Payne (1973) وذلك باخذ 1مل من نترات البوتاسيوم بتركيز0,2% الى 10مل من عينة الحليب والتحضين على 37م° الى ان يتكون لون احمر وينتج غاز بانبوبة درهام.

النتائج والمناقشة

الجدول (1) يوضح بان الاعداد الكلية للبكتريا بطريقة العد الميكروسكوبي المباشر تكون مرتفعة مقارنة بالطرق الأخرى ويرجع السبب في ذلك الى انه لا يمكن تمييز اعداد البكتريا الحية والميتة بهذه الطريقة بالرغم من انها كانت سريعة وعليه لا يمكن استخدام هذه الطريقة في الحكم على جودة الحليب المبستر او اي حليب معامل بالحرارة العالية والتي ادت الى قتل الاحياء المجهرية .بينما نجد في طريقة الاطباق المصبوبة القياسية اعطت نتائج جيدة اذ تم حساب عدد المستعمرات الحية بينما تعتبر طريقة بطيئة نتيجة التحضين لمدة 24ساعة وان كل مستعمرة قد تكون ناتجة من خلية بكتيرية واحدة او عدد من الخلايا البكتيرية وكانت الاعداد الكلية للبكتريا مقبولة اذ تراوحت اعداد البكتريا في الحليب بعد عملية البسترة مباشرة وبطريقة العد الميكروسكوبي المباشر من 35 - 150×10 5و.ت.م/مل وان اعداد البكتريا في الحليب ازدادت مع زيادة مدة الخزن حتى بلغت الاعداد من 185- 850ا ×105 و.ت.م/مل بعد 72ساعة من الخزن على درجة حرارة الثلاجة وذلك بسبب التلوث اثناء الخزن وتتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه أبو غرة واخرون (2013) الذين درسوا على 73 عينة حليب خام جمعت من مدينة دمشق وضواحيها حيث كان معدل عدد البكتريا بطريقة الاطباق المصبوبة ما بين 2.6× 610 و.ت.م/مل و 81.5 ×10 6 و.ت.م/مل. وكذلك الحال بالنسبة الى عينات الحليب المبستر والذي تم عد البكتريا بطريقة الاطباق المصبوبة حيث انه بالرغم من ان اعداد البكتريا بهذه الطريقة كانت اقل من اعداد البكتريا باستخدام العد الميكروسكوبي المباشر الا انه ايضا ازدادت اعداد البكتريا مع زيادة فترة الخزن حيث كانت هذه الاعداد بعد عملية البسترة مباشرة 15×410 و.ت.م/مل الى 17×10 5 و.ت.م/مل حتى وصلت الاعداد من 41×10 4 و.ت.م/مل الى 76×10 5 و.ت.م/مل بعد 72ساعة من الخزن في الثلاجة وهذا يعني زيادة في عدد البكتريا الحية خلال فترة الخزن. وهذه النتائج تتفق مع ما وجده El-Sadek واخرون (1974) اذ كان العدد الكلي للبكتريا في الحليب المبستر 82×10 3 و.ت.م/مل وفي الحليب الخام 107×10 6 و.ت.م/مل في حين وجد Fredman

(1978) معدل العدد الكلي للبكتريا في الحليب 90×10 3و.ت.م/مل وكذلك تتفق مع ما ذكره Tmran واخرون (2010).

جدول (1) الاعداد الكلية للبكتريا (و.ت.م/مل) بطريقتي العد الميكروسكوبي المباشروالاطباق المصبوبة
Table (1) Total count of bacteria (c.f.u/ml) using direct microscopic and standard plate count methods

عدد البكتريا بعد الخزن لمدة72 ساعة Total count of bacteria after 72 houres of storage	عدد البكتريا بعد الخزن لمدة 48ساعة Total count of bacteria after 48 houres of storage	عدد البكتريا بعد الخزن لمدة 24ساعة Total count of bacteria after 24 houres of storage	عدد البكتريا بعد البسترة مباشرة Total count of bacteria after pasterd zation	الطريقة Method
5 10×185 5 10×810	5 10×118 5 10×280	5 10×69 5 10×215	5 10×35 5 10×150	العد الميكروسكوبي المباشر Direct microscopic
4 10×41 5 10×76	4 10×32 5 10×49	4 10×28 5 10×33	4 10×15 5 10×17	طريقة الاطباق المصبوبة standard plate count

الجدول (2) يبين ان طريقة اختزال الصبغات بطريقة ازرق المثيلين والريزازورين والنترات اعطت نتائج غير مقبولة من ناحية الحكم على جودة الحليب مقارنة بطريقة الاطباق المصبوبة اذ قسمت عينات الحليب الى مجموعتين هي المجموعة الاولى والتي كانت اعداد البكتريا التي تم تقديرها بطريقة الاطباق المصبوبة كانت اقل من 50×10 3و.ت.م/مل اما المجموعة الثانية فهي عينات الحليب التي كانت فيها اعداد البكتريا اكثر من50×310و.ت.م/مل وتم اجراء اختبار الاختزال على هاتين المجموعتين من الحليب اذ وجد وكما هو واضح من الجدول (2) بان عينات الحليب التي كانت فيها اعداد البكتريا اقل من 50 ×10 3و.ت.م/مل احتاجت الى وقت اطول لاختزال الصبغات مما هو عليه في عينات الحليب التي كانت اعداد البكتريا فيها اكثر من 50×10 3و.ت.م /مل وهذا بسبب احتواء عينات الحليب للمجموعة الاولى على اعداد اقل من البكتريا مقارنة بالمجموعة الثانية مما ادى الى احتياج المجموعة الاولى الى وقت اطول لاختزال الصبغات على عكس المجموعة الثانية التي كانت فيها اعداد البكتريا التي تم عدها بطريقة الاطباق المصبوبة اعلى من المجموعة الاولى وبالتالي كان استهلاكها للاوكسجين اكثر مما قلل من زمن اختزال الصبغات وتتفق هذه النتائج مع ماذكره Muehiherr واخرون (2003) الذين درسوا على تلوث الاحياء المجهرية في الحليب الخام وفي خزانات جمع الحليب في سويسرا الذين وجدوا بان الحليب الخام الملوث بنسبة كبيرة كانت اعداد البكتريا فيه عالية واختزلت الصبغة بوقت قصير . ويلاحظ من نفس الجدول ايضا بانه مع زيادة فترة الخزن قل الوقت اللازم لاختزال الصبغات في كلا المجموعتين وذلك بسبب زيادة اعداد البكتريا مع زيادة فترة الخزن مما ادى الى زيادة استهلاكها للاوكسجين وبالتالي تقليل فترة الاختزال. وعندما خزن هذا الحليب على درجة حرارة الثلاجة كان الانخفاض في اختزال الصبغات واضحا وبصورة اكثر في العينات ذات الجودة المنخفضة وهذا يرجع الى التلوث السريع في الحليب ومن هذه نقترح استخدام طريقة اختزال الصبغات للحكم على جودة الحليب خاصة عند التحضين على 30مْ اذ تكون اكثر ملائمة للحليب المبستر ,وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Hofi (1992) اذ فحص 253 عينة من الحليب البقري والجاموسي باستخدام ازرق المثيلين والريزازورين واستنتج بان اختبار الريزازورين لمدة 10 دقائق لا يمكن الاعتماد عليه بينما لمدة ساعة او اكثر كان افضل على التمييز. وقسم Shalichev وPetrova (1970) العينات حسب العدد الكلي للبكتريا الى 5×10 5و.ت.م/مل و 5×10 5-4× 610 اوكثر من 4 ×10 6 و.ت.م/مل واستنتج بان اختبار اختزال الريزازورين لا يعكس جودة الحليب من الناحية البكتريولوجية بصورة مقبولة لذلك لا ينصح باستعماله

عمليا, بينما Harvath (1967) اجرى اختبار الريزازورين لفترات مختلفة على الحليب ووجد افضل توافقا مع الاعداد الكلية للبكتريا وكذلك مع اختبار ازرق المثيلين.

جدول (2) اعداد البكتريا و.ت.م/مل بطريقة الاختزال بازرق المثيلين والريزازورين والنترات
Table (2) Total count of bacteria (c.f.u/ml) using methylin blue resazurin dye and nitrate reduction methods

العينات التي فيها العدد	الاختبار Test	الخزن بالساعات Storage period in houres			
		صفر	24	48	72
اقل من50×10 3خلية/مل Samples contain less than $50x10^3$ cell/ml	ازرق المثيلين Methy lene blue	10,19	9,16	9,12	7,96
	الريزازورين Resazurin	10,19	9,16	9,12	8,12
	النترات Nitrate	9,12	8,14	8,30	8,86
العينات التي فيها العدد اكثر من50×10 3خلية/مل Samples contain more than $50x10^3$ cell/ml	ازرق المثيلين Methy lene blue	7,80	5,94	4,35	3,13
	الريزازورين Resazurin	7,19	5,96	4,24	3,13
	النترات Nitrate	8,12	6,74	5,58	4,60

يوضح الجدول (3) العلاقة بين اختزال الصبغات (ازرق المثيلين ,والريزازورين,والنترات) وطريقة الاطباق المصبوبة في الحكم على جودة الحليب اذ يلاحظ ان عينات الحليب الجيدة كانت عند مستوى 1% للتحليل الاحصائي عندما كانت اعداد البكتريا اقل من 50×10 3 و.ت. م/مل وكذلك اعداد البكتريا اعلى من 50×10 3 و.ت.م/مل.
في حين نجد اختزال الصبغات (ازرق المثيلين , والريزازورين والنترات) في عينات الحليب غير المخزنة والتي كان العدد الكلي فيها للبكتريا اقل من 50×10 3 و.ت.م/مل حيث كان لها اقل فرق معنوي عند مستوى 5% واقل علاقة للتحليل الاحصائي ونلاحظ عندما كان العدد الكلي للبكتريا في عينات الحليب غير المخزن والتي تم عدها بطريقة الاطباق المصبوبة والتي كان فيها العدد الكلي للبكتريا اكثر من 50×10 3 و.ت.م/مل فان فقط طريقة اختزال النترات كان لها اقل فرق معنوي عند مستوى تحلل احصائي 5% في عينات الحليب غير المخزن وهذه تتفق مع ما ذكره Kumars وvenkatest (2010) بان اختزال الصبغات طريقة يعتمد عليها في الحكم على جودة الحليب ومنتجاته من حيث احتوائه على الاحياء المجهرية مقارنة بطريقة الاطباق المصبوبة.

جدول(3) العلاقة بين اختزال الصبغات وطريقة الاطباق المصبوبة

Table (3) The relation ship between dyes reduction and standard plate methods

الخزن بالساعات Storage period in houres				الاختبار Test	العينات التي فيها العدد
72	48	24	صفر		
**0,97	**0,82	**0.71	*0,32	ازرق المثيلين Methy lene blue	اقل من10×50 3خلية/مل Samples contain less than $50x10^3$ cell/ml
**0,97	**0,82	**0,70	*0,24	الريزازورين Resazurin	
**1,00	**0,88	**0,63	*0,31	النترات Nitrate	العينات التي فيها العدد اكثر من10×50 3خلية/مل Samples contain more than $50x10^3$ cell/ml
**0,94	**0,91	**0,69	**0,83	ازرق المثيلين Methy lene blue	
**0,94	**0,92	**0,70	**0,85	الريزازورين Resazurin	
**0,89	**0,83	**0,89	*0,49	النترات Nitrate	

*عند مستوى5% **عند مستوى 1%

EVALUTION THE MICROBIAL METHOD USED TO JUDGE THE QUALITY CONTROL OF PASTEURIZED MILK

Dr.Khazal Shaaban Abdallah Dr.Ghanim Mahmood Hasan
Univercity of mosul- collage of agriculture –food science dep.
E-mail:Dralabbasi58@yahoo.com

ABSTRACT

The methods used to judge the quality control of milk counting microscopic direct and this method can be fast distingish of cells and identify the source of microbial contamination , but it is difficult to distinguish between living and dead cells and that they do not give acceptable results for the heat treatment milk . While the results showed in the way of standard plate count, although it is used along time of incubation they are calculated only living cells and the total count of bacteria less than in direct microscopic count range between 15x104 to 17x105 cfu/ml in the pasturide milk directly . in direct microscopic count While the dyes reduction test gave unacceptable results due to rapid contamination in milk and the count of the bacteria ranged between 35x105 to 150x105cfu/ml then the number of the bacteria increase with the increase of the period of the storage .the relationship between the method dyes reduction test and the standard plate count to judge the quality of raw milk , as the samples were good at the 1% level for statistical analysis while the samples stored when using the method of nitrates dyes reduction , the relationship level less than the quality of milk at a level of statistical analysis of 5% in judging the quality of milk .the samples of the milk divided to two groups the first one contain bacteria less than 50x103 cfu/ml and the other contain more than 50x 103

cfu/ml we find that the samples contain bacteria less than 50x103cfu/ml needs more time to reduce the pigments.

Received: Accepted:

المصادر

أبو غرة، صياح وسليق، سمير وأبو يونس، عهد (2013). تشخيص بكتريا Salmonella SPP. المعزولة من الاجبان البيضاء المصنوعة من حليب الغنم . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية .المجلد 29 العدد1 الصفحات 129-141.

b.p.marmion and a.simmons(1996).practical medical microbiology .14th ed.churchill livingston.(14):173-174

EL-Sadek,G.M., S.A.Mohamoud ,A.H.Dawood (1974).Bacterial survey of total and spore count in egyption raw milk. J. Egyptian Microbiology.9(8-1).

FDA (Food and drug administration) (2001) .aerobic plate count. bateriological analytical manual on line. us fda cfsan.(cited aug 20)available from : http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-3.htm.

Fredman,I.L. (1978).Studies of the quality of milk in the Dairy factory .International dairy conger.E.). 104-105(5

Graham,C. (1980).The Safety of food. AVI Publising com. Westport. Connection Collee,j.;A.G.Fraser.

Harvath, G. (1967). Milk quality evaluation by resazurin test.Dairy Sci.Abst.30,550*Kumar,S.,M.Nandy and K. V. venkatest (2010). Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rate of microbiology. African J.of Microbiology.4(1061-1071).

Hofi,A.A. (1992).Studies on market baffulo,s milk. The ten minutes and one hour resazurin test.Indian J.Dairy Sci.16,196.

muehiherr,j.e.,c.zweifel.;j.e. blanco.and r. stephan.(2003). microbiological quality of raw goats and ewes bulk tank milk in switzerland. jornal of dairy science 86(12):3849-3856.

murphy, s.c.and k.j. boor(2000). troubleshooting source and causes of high bacteria count in raw milk. dairy, food environ. sanit. 20(8):606-611.

Payne, W.J. (1973).Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bact.rev.37(409).

sas (statical analytical system) .(2010). sas institute inc., cary,nc.

tmran, A.K.,Somrote, and Ch.pisit(2010).Predication of raw milk microbial quality using data ming techniques. Agricultural information research. Vol.19(64-70).

zeng ,s.s and e.n, escobar (1996). effect o breed and milking method on somatic ceii count, standerd plate count and composition of goat milk . smail rumon. res. 19: 169-175.

zweifel, c.; j.e. muehlherr.; m.ring.and r.stephan(2005). influnce of different factor in milk production on standard plate count of raw small ruminants bulk tank milk in switzerland .small ruminant research . 58:63 -70.