



المعمل الأول

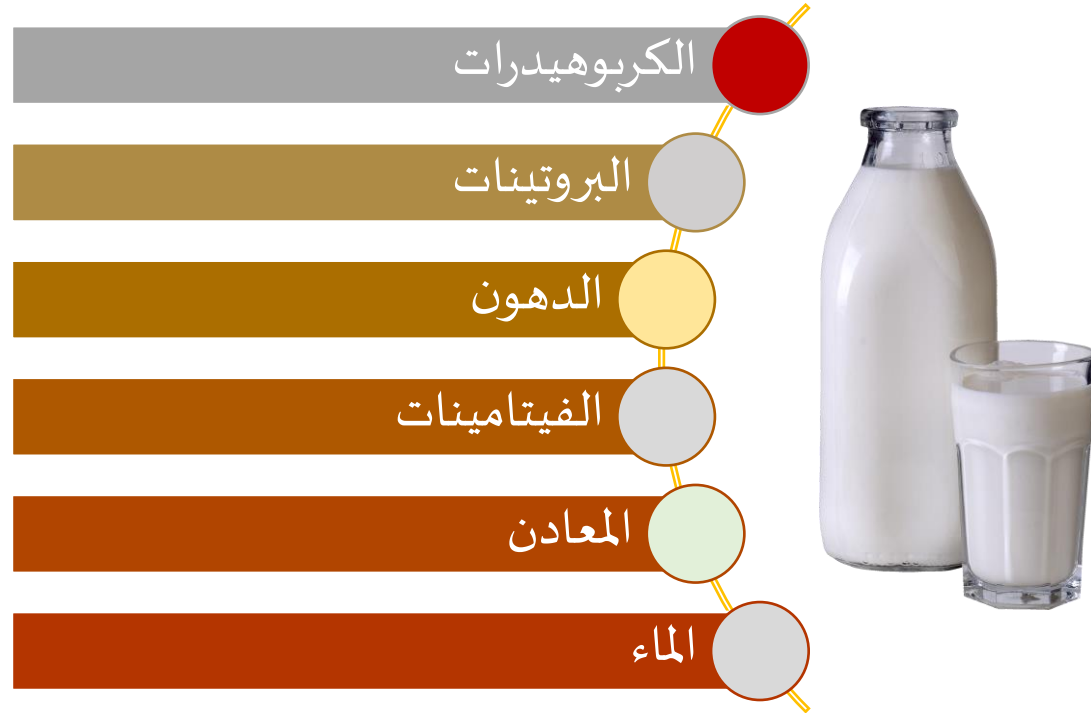
ميكروبيولوجيا الألبان

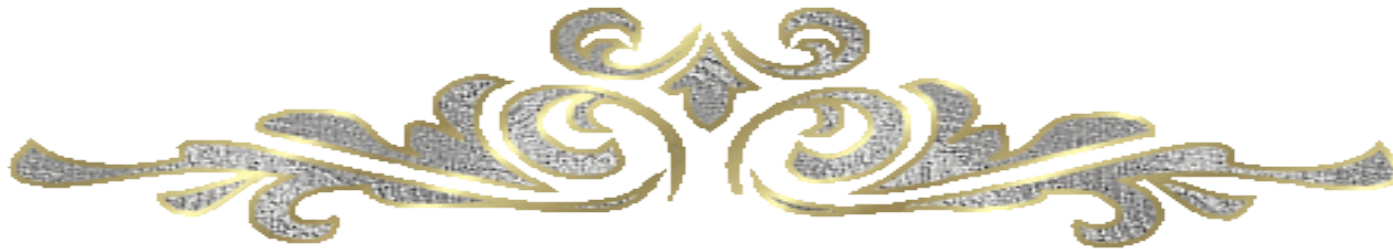
نورة الكبيسي





يعد الحليب من الأغذية ذات القيمة الجيدة التي تمد الجسم بالعديد من العناصر الغذائية التي يحتاج إليها.
ويمتاز باحتوائه على الأقسام الستة الرئيسة للغذاء، وهي:



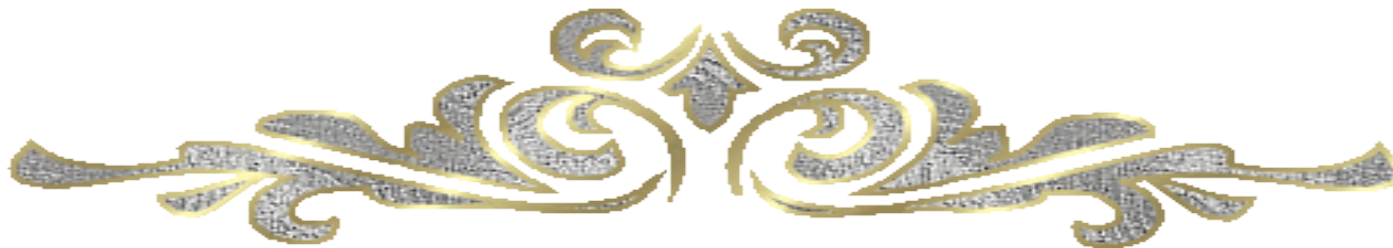


يمتاز الحليب بأنه:

من أفضل المصادر على الإطلاق لتزويد الجسم
بعنصري الكالسيوم والفوسفور المهمين لبناء العظام
وسلامتها في الأطفال والبالغين.

وتوجد العناصر الغذائية في الحليب ومنتجاته بصورة
يسهل على الجسم الاستفادة منها.





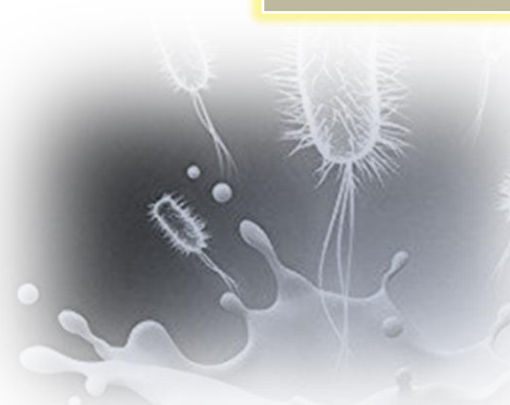
تنقسم الميكروبات الى قسمين

2- ميكروبات ممرضة
Pathogenic microorganism

1- ميكروبات غير ممرضة
Saprophytic
(non-pathogenic)

ب. ميكروبات مرغوب فيها
(تضاف الى الحليب لصناعة منتجات
الحليب مثل الألبان المتخمرة)

أ. ميكروبات غير مرغوب فيها
(تسبب فساد الحليب)



2- ميكروبات ممرضة

Pathogenic microorganism

(الميكروبات التي تسبب فساد الحليب)

وتقسم هذه الميكروبات على حسب تأثيرها على مكونات الحليب

ج- البكتيريا المحللة للدهن

Lipolytic bacteria

*Achromobacter and
Enterobacter*

وتؤدي إلى تكسر دهن الحليب عن طريق إفراز أنزيم الليبيزوتؤدي إلى تغييرات غير مرغوب فيها

(زرنخة وطعم مر)

ويزداد نشاط هذه الميكروبات على درجات الحرارة المنخفضة

ب- الميكروبات المحللة للبروتين

Proteolytic organism

تهاجم البروتين محولة إياه إلى أحماض أمينية (يوريا+نشادر)

مثل:

1- *Bacillus subtilis* 2- *Proteus vulgaris* 3-

Actinomyces

4- Fungi e.x: *Penicillium* , *Fusarium* and

Aspergillus

وتتميز هذه الميكروبات بمقاومتها لدرجة حرارة البسترة وتحلل البروتين منتجة طعما مرا في الحليب المبستر.

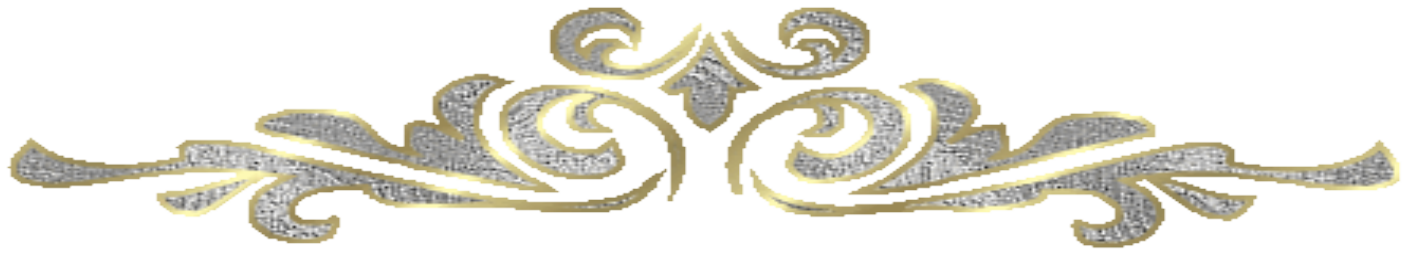
أ- ميكروبات تخمر اللاكتوز

ومن أمثلتها الميكروبات السبحية ، والميكروبات العقدية والتي تخمر اللاكتوز وتحوله إلى حمض

اللاكتيك وميكروبات القولون المعوية

Clostridium perfringens - *E.Coli*

وتتميز بقدرتها على تخمر اللاكتوز وتحويله إلى حمض اللبن مع غازات



كيف يصنع الحليب؟

يصنع اللبن من الحليب باستخدام مزرعة نقية من بعض الأحياء الدقيقة النافعة

التي تحول الحليب إلى مادة أكثر لزوجة لها طعم حامضي و نكهة مميزة مقبولة

لدى المستهلك.

كما تحدث الأحياء الدقيقة المستخدمة أيضا تغيرات عديدة في مكونات الحليب

الذي يتم تحويله إلى اللبن، وتعد هذه التغيرات مفيدة للإنسان حيث يتحول

معظم سكر الحليب إلى حمض لبن.



وهذا التحول في حد ذاته مفيد من عدة أوجه منها:

* ظروف حامضية تزيد ذوبان الكالسيوم والحديد، مما يؤدي إلى زيادة امتصاصهما في الجسم.

وتؤدي زيادة امتصاص الكالسيوم في الدم إلى إرجاع مستواه في هذا السائل الحيوي إلى المستوى الطبيعي، وبالتالي المحافظة على تناسق العضلات ومنع ارتشافه من العظام ودفعه للدم مما يحافظ على سلامة العظام.

* القضاء على البكتيريا الموجودة في الامعاء، مما يمنع حالات الإسهال والتسممات الغذائية.



* تنتج بعض المضادات الحيوية التي تحد من نمو الأحياء الدقيقة الضارة التي تستوطن الأمعاء.

* تحول الأحياء الدقيقة بروتين الحليب إلى وحدات بسيطة يسهل امتصاصها من الجسم دون الحاجة إلى الهضم، مما يخفف أعباء عملية الهضم.



* يحتوي اللبن أيضا على كميات أكبر من الفيتامينات مقارنة بالحليب؛ لأن البكتيريا المستخدمة في التصنيع تساهم في تكوين بعض الفيتامينات التي تعد مهمة في الاستفادة من العناصر الغذائية الأخرى - مما يمكن الجسم من أداء وظائفه على الشكل المطلوب.

* لبعض أنواع الألبان تأثيرا مخفضا لمستوى الكوليسترول في الدم عن طريق تأثيرها على أملاح الصفراء والحد من استخدامها في تصنيع كميات كبيرة منه في الجسم. ولقد أوضحت العديد من الدراسات أن لهذه الألبان تأثيرا منشطا لجهاز المناعة، كما أن لها تأثيرا على منع الإصابة ببعض الأمراض السرطانية التي تصيب الأمعاء.



تنقسم الميكروبات الممكن تواجدها في الحليب الخام إلى

2- بكتيريا غير ممرضة
non-pathogenic

1- بكتيريا ممرضة
pathogenic

ب- بكتيريا مرغوب فيها لصنع
اللبن الرائب

أ- بكتيريا غير مرغوب فيها
تسبب فساد للحليب

Listeria monocytogens

Salmonella sp

Bacillus cereus





أولاً: **الميكروبات التي تسبب فساد الحليب:**

- يعد الحليب بيئة غذائية ملائمة لنمو الاحياء المجهرية عند توفر درجات الحرارة الملائمة، فهو غني بالبروتينات والكربوهيدرات والدهون والمعادن والفيتامينات المهمة بالإضافة الى دالة الحموضة الملائمة (7.6) ورطوبته الملائمة للنشاط الميكروبي، لذلك فهو عرضة للتلف بالبكتيريا و الاعفان والخمائر وبصورة سريعة .

- قد يصبح الحليب وسطا ناقلا لكثير من الامراض للإنسان مثل: Q-fever و Malta fever و التسمم الغذائي بالسموم المعوية لبكتيريا *Streptococcus pyogenes* في حال لم يستر بالصورة الصحيحة.
- ومن الاجناس الشائعة في الحليب التالي:

Micrococcus , Coli forms, Lactobacillus , Streptococcus

- كما توجد انواع ممرضة مختلفة باختلاف مصدر التلوث وتشمل:

الحيوان: *Mycobacterium bovis, Staph. aureus, Brucella* .

الانسان: *Salmonella , Shegella* .

البيئة: *Clostridium , Bacillus* .



ميكانيكية تلف الحليب بالأحياء المجهرية:

يحتوي الحليب الخام عددا قليلا من البكتيريا الشائعة التواجد كما ذكرنا آنفاً، وعادة لا تنمو هذه البكتيريا بصورة ملحوظة اذا تم معالجة الحليب بصورة

صحيحة ، أما عند ترك الحليب الخام لعدة ساعات في حقل الانتاج فسرعان ما تبدأ فيه التغيرات التالية:

1- تبدأ الاعداد البكتيرية بالانخفاض لفترة قصيرة تسمى (Bactericidal phase) بسبب احتواء الحليب على مواد مضادة للبكتيريا مثل : Lysozyme , Lactenin
Leucocytes, Lactoferrines. ويعد Lactenin أشد هذه المواد تأثيرا على البكتيريا إذ يتكون من ثلاث مواد تعمل سوية ضد البكتيريا هي: Lactoperoxidase,
. Thiocyanatase, Hydrogen peroxidase

2- بعد انتهاء المرحلة الاولى تنشط مسببات الحليب Streptococcus lactis في درجات الحرارة الدافئة كون هذه البكتيريا تمتاز بسرعة استهلاكها لسكر الحليب (اللاكتوز)
وتكوين حامض اللاكتيك فتصل نسبة الحموضة الى (1%) وينخفض ال pH الى (6.7) وهذا يسبب توقف نمو مسببات الحليب.



3- المرحلة الثالثة هي نشاط عصيات الحليب Lactobacillus الأكثر مقاومة للحموضة اذ ترفع نسبة الحموضة الى (2%) وبذلك يتوقف نمو بقية فلورا الحليب.

4- عند انتهاء مرحلة تحول سكر اللاكتوز الى حامض اللاكتيك تبدأ مرحلة اكسدة الحامض من قبل الاعفان والخمائر حيث يتحول الى ماء و CO2 لاسيما عنف Geotrichum
وتبعاً لذلك تنخفض الحموضة.



5- تنشط البكتيريا المعفنة مثل Bacillus و Proteus, Pseudomonas و Achromobacter والعديد من الاعفان حيث تحلل ما تبقى من بروتين ودهون فيتحول الحليب الى
سائل عفن متزنخ.

(A) تلف الحليب الخام

يحتوي الحليب الذي حلب للتوما بين (10^2 - 10^3) بكتيريا /مل وان العد البكتيري اللازم لإحداث تغيرات غير مرغوبة من لون وطعم يتطلب (10^7) خلية /مل.

لذا من اهم المشاكل الميكروبيولوجية التي تحدث في الحليب الخام التالي

الشكل تحت المجهر	الاستجابة لصبغة جرام	الكائن المسبب	طبيعة التغيرات
عصوي-متجرثم	موجبة لجرام	<i>Bacillus cereus</i>	تجبن حلو (بسبب افراز انزيم Renin وترسببب ال Casain وليس بسبب الحموضة)
صولجاني الشكل متجرثم	موجبة لجرام	<i>Clostridium & Coliforms</i>	تجبن غازي (تكوين كمبية كبيرة من الغازات)
عصوي مفرد-اسواط	سالبة لجرام	<i>Alcaligenes</i>	لزوجة في الحليب (بسبب انتاج الكبسولة)
عصوي	سالبة لجرام	<i>Ps. fluorescence</i>	طعم غير مرغوب فيه نتيجة تحلل الحوامض الشحمية
عصوي	سالبة لجرام	<i>Serretia marcescns</i>	تلون الحليب بلون احمر



(B) تلف الحليب المبستر

عملية البسترة هي تعريض الحليب لدرجة حرارة (72م) لمدة (15ثانية) أو درجة (63م) لمدة (30 دقيقة) وذلك للسيطرة على البكتيريا الممرضة (مثل السل والسالمونيلا والبروسيلات والستيريا) وإطالة فترة الخزن.



يحدث تلف الحليب المبستر بسبب:

- مقاومة عدد من البكتيريا الخضرية المحبة للحرارة (Thermophilic bacteria)

مثل: *Lactobacillus thermophilus*

- البكتيريا المقاومة لحرارة البسترة (Thermoduric)

مثل: *Bacillus subtilis*, *Microbacterium*, *Micrococcus*.

(C) الحليب المجفف

يصنع هذا النوع بإزالة جزء من الماء من الحليب ثم يعقبه عملية مجانسة ويعامل بالحرارة قبل أو بعد التعليب لمنع فساده.

عند الفحص الميكروبي للحليب المجفف يلاحظ تكون البكتيريا الناتجة متشابهة أي أن المزرع نقي (Pure culture) وهذا يدل على

أن التلوث ناتج عن وجود جراثيم البكتيريا المقاومة للمعاملة الحرارية ، أما اذا كان المزرع عبارة عن مزيج من الاحياء المجهرية فذلك

يدل على عدم كفاءة المعاملة الحرارية أو حدوث تلوث اثناء الاستخدام او اثناء الفحص.



(D) الحليب المعقم

يعقم الحليب باستخدام درجة حرارة عالية (121 م) لمدة (15-20 دقيقة) ويعبأ بقناني زجاجية او معدنية وهذه الطريقة يتم القضاء

على كافة الميكروبات التي تسبب فسادة اثناء خزنه تحت الظروف الاعتيادية.

وقد تتواجد اعداد قليلة من البكتيريا المقاومة لحرارة التعقيم والمكونة للجراثيم مثل:

Clostridium sp - Bacillus sp





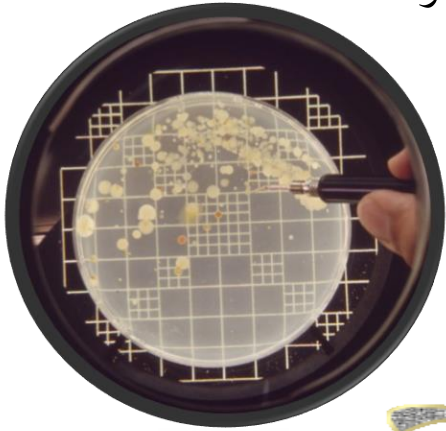
طريقة العمل:

○ من ممكن اجراء اكثر من طريقة للكشف عن تلوث الحليب من عدمه

1- Direct microscopic count (Breed method)

- أ. تمزج العينة جيدا لنشر البكتيريا بشكل متساوي في الوسط وينقل (0.01مل) من الحليب ويُنشر على مساحة مربع طول ضلعه (1سم) ، يجفف ببطيء حتى لا تتكون فراغات في الغشاء .
- ب. يوضع الشريحة الزجاجية على حمام مائي يغلي لمدة (5 دقائق) لتثبيت غشاء الحليب بالبخر.
- ج. تغمر الشريحة الزجاجية بالزايولول لمدة دقيقة واحدة لإزالة الحبيبات الدهنية ثم بالكحول لإزالة الزايولول ثم تغمر الشريحة الزجاجية في الماء المقطر المعقم وليس ماء جاري حتى لايزال الغشاء.
- د. يصبب بصبغة methylene blue لمدة (15 ثانية) ثم يغطس بالماء لإزالة الصبغة ثم تجفف بالهواء.
- هـ. تفحص عدة حقول ويستخدم القانون التالي لحساب عدد البكتيريا:

$$\text{عدد البكتيريا/مل} = \frac{\text{(مجموع البكتيريا/عدد الحقول)}}{\text{الحجم المستخدم}} \times \text{مقلوب التخفيف}$$





Standard plate count -2

يمكن عزل بعض الميكروبات من الحليب معمليا كالتالي :

1- احضر عينات من الحليب المراد فحصها

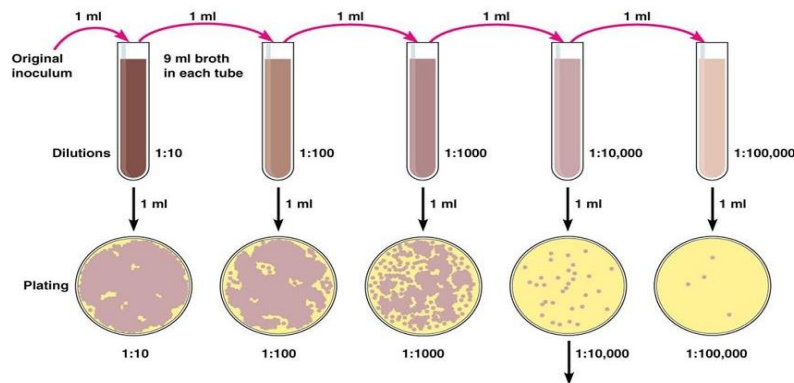
2- عمل تخفيف عشيرة من الحليب المراد فحصه (10-100-1000-10000-100000)

3- انقل 1 مل من التخفيف السابقة الي اطباق بتري تحتوي على بيئة Nutrient agar بواسطة ماصة معقمة لكل تخفيف.

4- حضن الأطباق عند 35 م لمدة 48 ساعة ثم افحصها وعد المستعمرات.

5- اصبغ المستعمرات السابقة بصبغة جرام للتعرف على الأنواع البكتيريا الملوثة للحليب.

6- سجل النتائج.



Calculation: Number of colonies on plate \times reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $1/10,000$ dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000$ bacteria/ml in sample.)

3- اختزال الصبغة Dye reduction test

يستخدم هذا الاختبار لمعرفة الفعالية الحيوية للبكتيريا في الحليب اذ يتناسب النشاط طرديا مع العدد وحسب معدل تنفسها تهيأ الظروف اللاهوائية فتختزل الصبغات.

يستخدم لهذا الغرض نوعان من الصبغات هما . Methylene blue , Resozurine

أ. ينقل (10 مل) من الحليب الى انبوبة اختبار معقمة ذات سداد لولبي و يضاف لها (1 مل) من صبغة Methylene blue وتمزج جيدا بقلب الانبوبة بهدوء ويجب التأكد من عدم وجود فقاعات غازية حتى لا تتأكسد الصبغة.

ب. 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

ت. تقييم جودة الحليب كالآتي:

1. ممتاز: اذا لم تختزل الصبغة خلال فترة تزيد عن ثمان ساعات.
2. جيد: اذا اختزلت الصبغة خلال فترة 6-8 ساعات.
3. وسط: اذا اختزلت الصبغة خلال فترة 2-6 ساعات.
4. رديء: اذا اختزلت الصبغة خلال فترة اقل من ساعتين.



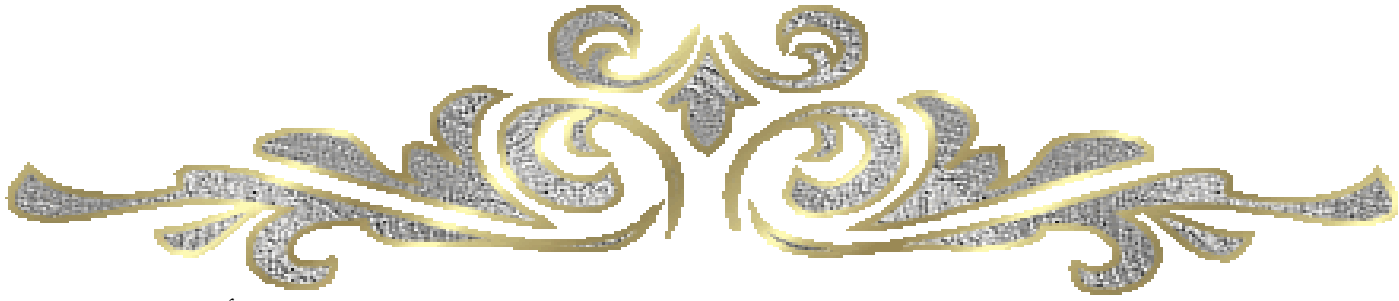
للكشف عن هذه الانواع البكتيرية :

تمتاز الكائنات الحية الدقيقة بقدرتها على استغلال الظروف الملائمة لنموها لذلك يطلق عليها **انتهازية** Opportunistic وتعتبر

المنتجات الغذائية بيئات مناسبة للنمو الميكروبي عند توفر ظروف الفساد الغذائي من تصنيع وتخزين واستهلاك مما يحدث

للإنسان العديد من الأضرار الاقتصادية والمشكلات الصحية.





ب- ميكروبات مرغوب فيها : تضاف الى الحليب لصناعة منتجات الحليب مثل الألبان المتخمرة

Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus

- Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus -Bifidobacterium

- تم تحويل الحليب الى لبن رائب بواسطة ميكروبات مفيدة يطلق عليها لقب خميرة اللبن أو عصيات اللبن لأثها بكتيريا عسوية.

- حيث تعمل هذه الكائنات الدقيقة على تحويل سكر اللاكتوز في الحليب إلى حمض اللبن مما يعمل على تحويل الحليب إلى حالة شبه صلبة، وتعمل البكتيريا على ذلك بشرط توافر الشروط المناسبة لها من حرارة ورطوبة وغذاء.

ولأنه يتم استهلاك سكر اللاكتوز بتحويله إلى حمض اللبن، فإن مئة غرام من اللبن الرائب تعطي فقط خمساً وعشرين سعراً حرارياً، وذلك ملائم جداً للأشخاص الذين يقومون بمحاولة إنقاص وزنهم).

كما أفادت الدراسات والتجارب بأن اللبن الرائب يعمل على القضاء على جراثيم التسمم الغذائي؛ ك *Salmonella sp* والبكتيريا العنقودية، ومنع مرض الزحار الأميبي والإسهالات، فإنه سهل الهضم وغني بالمواد الغذائية المفيدة للجسم.

طريقة تحويل اللبن السائل إلى لبن رائب

يسخن اللبن إلى 80 درجة مئوية لقتل البكتريا الضارة غير المرغوب فيها ولتغيير خواص بروتينات الحليب حتى تتجمع معا بدال من تخثرها

يبرد الحليب الى حوالي 54 درجة مئوية، تضاف البادئات البكتيرية ويتم الحفاظ على هذه الحرارة لمدة 5-7 ساعات حتى يتخمر الحليب. ومن المعروف أن تخمر اللاكتوز (سكر اللبن) إلى حمض اللاكتيك الذي يحلل بروتين اللبن ليعطي الزبادي قوامها ونكهتها القوية.

ويمكن تصنيع الزبادي أيضا من بدائل الحليب مثل حليب الصويا لمن يعانون بما يسمى (حساسية سكر اللاكتوز- الكازين) وقد عرف الانسان الزبادي منذ ما لا يقل عن 5488 عام وتمثل اليوم احد الأغذية الشائعة في العالم بأسره.

ويتميز الزبادي بقيمته الغذائية وفوائده الصحية التي لا مثيل لها من حيث غناها بالبروتين ، الكالسيوم وفيتامين ب2 وفيتامين ب7 وفيتامين ب12.

فوائد تحول الحليب إلى لبن رائب

1. ظروف حامضية تزيد ذوبان الكالسيوم والحديد، مما يؤدي إلى زيادة امتصاصهما في الجسم. وتؤدي زيادة امتصاص الكالسيوم في الدم إلى إرجاع مستواه في هذا السائل الحيوي إلى المستوى الطبيعي، وبالتالي المحافظة على تناسق العضلات ومنع ارتشافه من العظام ودفعه للدم مما يحافظ على سلامة العظام

2. القضاء على البكتيريا الموجودة في الأمعاء مما يمنع حالات الاسهال والتسمم الغذائي

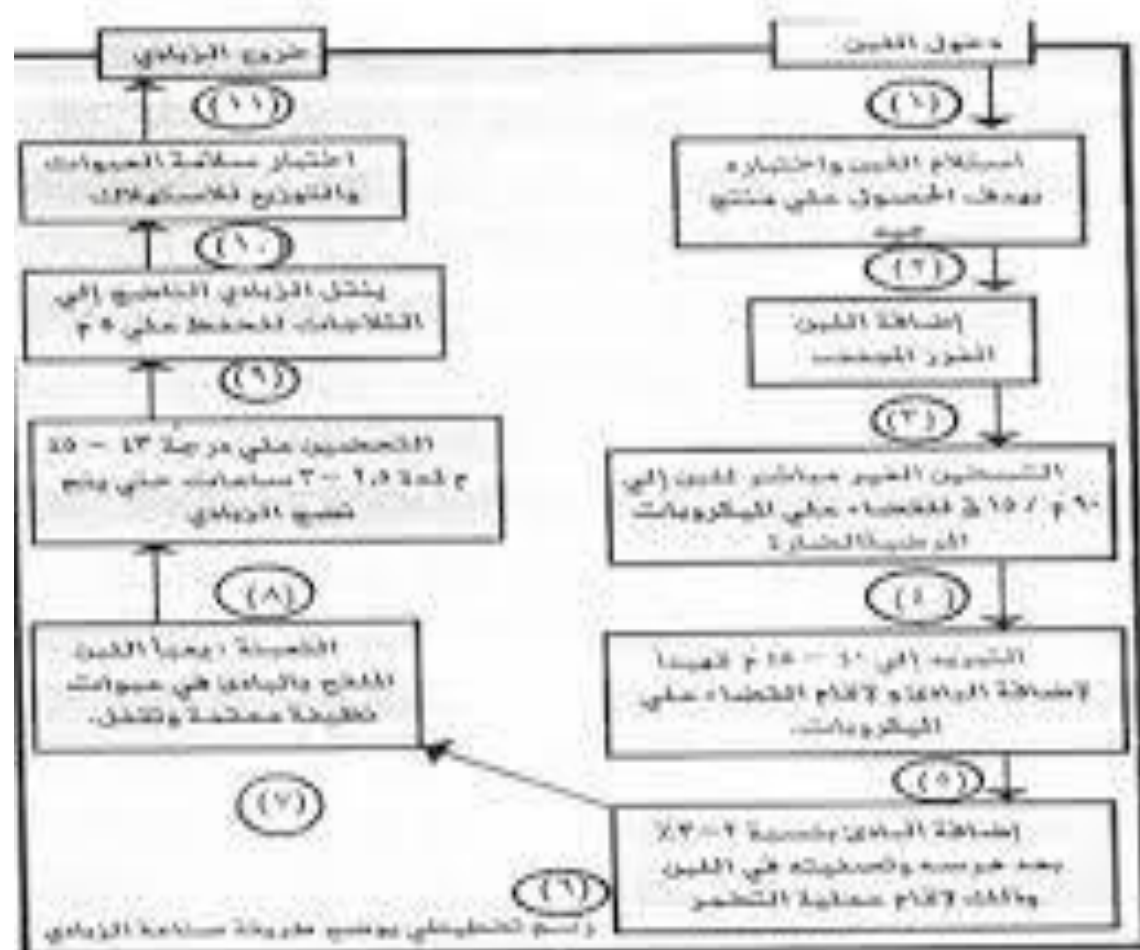


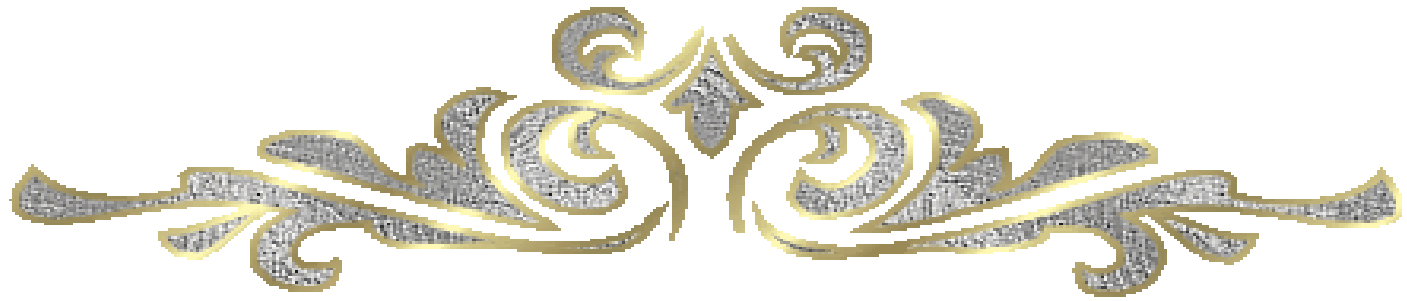
3. تنتج بعض المضادات الحيوية التي تحد من نمو الأحياء الدقيقة الضارة التي تستوطن الأمعاء

4. تحويل الأحياء الدقيقة بروتين الحليب إلى وحدات بسيطة يسهل امتصاصها من الجسم دون الحاجة إلى الهضم، مما يخفف أعباء عملية الهضم



5. يحتوي اللبن أيضا على كميات أكبر من الفيتامينات مقارنة بالحليب؛ لأن البكتيريا المستخدمة في التصنيع تساهم في تكوين بعض الفيتامينات التي تعد مهمة في الاستفادة من العناصر الغذائية الأخرى - مما يمكن الجسم من أداء وظائفه على الشكل المطلوب





نهاية المعمل الأول

