

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي



جامعة أسيوط / كلية العلوم / قسم علم النبات

بحث مقدم للحصول على درجة البكالوريوس بعنوان:

# الكشف عن البكتيريا الموجودة في انواع من الحليب المتداول في بعض احياء مدينة سبها

مقدم من:

مريم خليفة علي محمد

صفاء محمد علي التوهامي

إشراف/ الأستاذتين:

مسعودة عمر خليفة

فادية جمعة محمد إشعيوي

خريف 2015 م

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

﴿وَإِنْ لَكُم فِی الْأَنْعَامِ لَعِبْنَةٌ تَنْسِقُكُمْ مِمَّا فِی بُطُونِهِمْ مِنْ

بَيْنِ فَرْثٍ وَدَمٍ لَبَنًا خَالِصًا سَائِغًا لِلشَّامِرِیْنَ﴾

صَدَقَ اللهُ الْعَظِیْمُ

الآیة 66 من سورة النحل

## الإهداء

الحمد لله حمداً كثيراً طيباً مباركاً فيه على كل حال، سبحانك لا نحصي ثناءً عليك  
كما اثنتيت انت على نفسك، خلقت فأبدعت، و اعطيت فأفضلت، فلا حصر لنعمتك و  
لا حدود لفضلك و صلى الله و سلم على اشرف عبادك و اكمل خلقك خاتم الانبياء  
و المرسلين و معلم المتعلمين نبينا و رسولنا محمد بن عبد الله الامين خير من علم و افضل  
من نصح.

ارسل بقلبي ثم بقلمى بخطوط براقه لامعة اسمى آيات الاحترام و المحبة و الشكر  
إلى الزائرين و الضيوف الكرام فلهم منا الف تحية و شكر و تقدير لهم و لا ننسى  
الاصدقاء و الاحباب.

كما نقدم كل الشكر لوالدينا العزيزين اللذان لم يبخلا علينا بدعمهم لنا فلولاً هذا  
الدعم و المساعدة ما وصلنا لهذه المرحلة.

## بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ مَعْرِفَاتُ الْبَحْرِ مَجْلَدُ ٣١٣

لا يسعنا بعد الانتهاء من إعداد هذا البحث إلا أن نتقدم بجزيل الشكر و عظيم الامتنان إلى الاستاذة الفاضلة: مسعودة عمر خليفة، التي تفضلت بالإشراف علينا و التي لم تبخل بكل ما لديها من معلومة و مراجع و على كل ما قدمته لنا من نصائح و توجيهات طيلة فترة البحث، فلها منا الشكر و التقدير.

شكرنا موصول إلى الاستاذة فادية جمعة محمد إشعيوي التي قدمت لنا يد المساعدة في هذا البحث ليكون في افضل صورة.

شكرنا يمتد إلى آبائنا و امهاتنا و اخوتنا و اخواتنا لصبرهم و دعمهم لنا طيلة فترة دراستنا.

أخيراً لا يفوتنا أن نتقدم بخالص الشكر و الثناء إلى كل من ساعدنا في اتمام هذه الدراسة و نخص بذلك أ. فاطمة علي التوهامي، أ. محمد علي التوهامي، أ. عبدالله آدم موسى، أ. علي ابراهيم عمر البصير، أ. الصديق خليفة علي، أ. شمسي عبدالله، أ. ابوبكر عمران، رقية عبدالله و فاء آدم موسى، فلكم منا جميعاً همسة شكر من اعماق القلب.

# الجداول

الصفحة	الجدول
12	1. نتائج العد الكلي للبكتيريا في عينات الحليب المختبرة. ....
17	2. نتائج اختبار Api20. ....

# الأشكال

الصفحة	الشكل
7	1. عينة لحليب الابل و الابقار المستهدفة للدراسة. ....
11	2. الوصف الظاهري للمستعمرات البكتيرية. ....
15	3. اختبار صبغة جرام . ....
19	4. اختبار بكتيريا <i>Ew. americana</i> على اشرطة E api20. ....

# المحتويات

الصفحة

الموضوع

	..... الآية القرآنية
	..... الإهداء
	..... كلمة شكر و تقدير
1	..... <b>1.1 المقدمة</b>
2	..... 1.2 حفظ الحليب
2	..... 1.3 الميكروبات الموجودة في الحليب
3	..... 1.4 فساد الحليب
4	..... 1.5 طرق الكشف عن ميكروبات الحليب
6	..... 1.6 الهدف من البحث
	..... <b>2. المواد وطرق العمل</b>
7	..... 1.2 جمع العينات
7	..... 2.2 وسط النمو
8	..... 2.3 اختبار العد الكلي
8	..... 2.4 صبغة جرام
9	..... 2.5 الوسط التفريقي
9	..... 2.6 اختبار انزيمي التنفس الكتاليز و الاوكسيديز
10	..... 2.7 اشرطة API 20E
11	..... <b>3. النتائج و المناقشة</b>
21	..... 4. الخلاصة
22	..... 5. التوصيات
23	..... 6. المراجع العربية
23	..... 7. المراجع الأجنبية
	..... <b>8. الملاحق</b>
26	..... 1.8 ماركات الحليب المستهدفة للدراسة
27	..... 2.8 نتائج العد الكلي لعينة الحليب رقم 4 لتخفيفات 10-2، 4، 6

المقدمة

**Introduction**

## 1.1. المقدمة

الحليب سائل طبيعي ناتج من افراز غدد الثديي لأنثى الانسان و الحيوانات الثديية، و يعد الغذاء الاول الذي يتناوله المولود بعد ولادته مباشرة سواء كان هذا المولود انسان أو حيوان ثدي (Harding, 1995). يحتوي الحليب على العديد من العناصر الغذائية المفيدة و التي تختلف نسبتها من نوع إلى آخر باختلافات طفيفة ( Alan Narnam & Jan Juther, 1994; Kittivachra *et al.*, 2006). يمتاز الحليب باحتوائه على الأقسام الستة الرئيسة للغذاء و التي تشمل الماء بنسبة 87 %، السكريات خاصة سكر اللاكتوز بـ 5 %، 3 % بروتينات، 3.5 % دهون، 1 % املاح معدنية و انواع من الفيتامينات كفيتامين أ، ب، و ج، كما يعد الحليب و منتجاته من أفضل المصادر على الإطلاق لتزويد الجسم بعنصري الكالسيوم و الفوسفور المهمان لبناء العظام و سلامتها في الأطفال و البالغين ( Megha & Annadurai, 2014). يأتي أو يتواجد الحليب بعدة أشكال منها الحليب الطازج، الطازج المبستر، الحليب المعقم، الحليب المجفف و الحليب المكثف المحلى، الفرق الأساسي بينها جميعاً هو في الطريقة التي تمّت بها معالجة الحليب و أيضاً طريقة تخزينها، ناهيك عن مشتقات الحليب الأخرى المتمثلة في الاجبان و الزبادي "ياغورث" و الزبدة و القشدة. في العام 2005 بلغ الانتاج العالمي من الحليب أكثر من 644 مليون طن منها 541 مليون طن من حليب الابقار، الاتحاد الاوروبي كانت له الحصة الاكبر من الانتاج بنسبة بلغت 142 مليون طن، ثم الهند بـ 88 مليون و امريكا بـ 80 مليون طن فروسيا بـ 31 مليون طن، صناعة الاجبان هي الأخرى كان الاتحاد الاوروبي خاصة اوروبا الغربية المنتج الاول لها بنسبة بلغت 8.6 مليون طن تليه امريكا بـ 4.8 مليون طن (Anonymous, 2007). الحليب غذاء جيد ليس للإنسان و الحيوان وحسب بل أيضاً للكائنات الحية الدقيقة؛ إذ يحتوي على معظم العناصر اللازمة للنمو و بالتالي يُعد بيئة جيدة و صالحة لنمو و تكاثر العديد من الميكروبات.



## 1. 2. حفظ الحليب

كما ذكر الحليب بيئة جيدة لنمو العديد من الميكروبات مثل البكتيريا و الفطريات بما فيها الخمائر، فبمجرد تواجد هذه الميكروبات في الحليب تبدأ بسرعة عند توفر الظروف الحرارية المناسبة في النمو و التكاثر؛ مسببةً فساد و تلف الحليب، لهذا على المستهلكين و صانعي و منتجي الحليب منع تلوثه و حفظه لفترات طويلة دون أن يحدث فيه تغيرات غير مرغوب فيها، يسعى الانسان لحفظ الغذاء بما فيه الحليب بهدف منع نمو الميكروبات به و يكون الحفظ إما بمنع و إبعاد التلوث الميكروبي، أو تثبيط النمو الميكروبي أو قتل الميكروبات (مبارك و آخرون، 2005). درجة حرارة الحليب عند حلبه تكون في حدود 35° م و هي درجة تساعد معظم أنواع البكتريا على النمو السريع؛ لذا يحفظ الحليب و مشتقاته من التلف السريع بعدة طرق تشمل طريقة التبريد و المعاملة الحرارية، فطريقة التبريد تعتبر من اهم وسائل حفظ الحليب بحالة جيدة مدة طويلة، هذه العملية لا تقضي على البكتريا لكنها توقف نشاطها وتكاثرها؛ خاصة التبريد المفاجئ، حيث وجد ان حفظ الحليب في درجة حرارة 10° م تحميه من التلف لمدة تقرب من 86 ساعة (عبد الحافظ و مبارك، 1996)، اما اذا حفظ في درجة حرارة 15° م فإنه يتلف بالحموضة بعد مضي 52 ساعة، هذا و ان انسب درجة حرارة لتبريد الحليب و حفظه لمدة طويلة تقع في المدى الحراري ما بين 4- 7 درجات مئوية، إضافة إلى ذلك تعد عملية بسترة الحليب و تعقيمه هي الاخرى من طرق حفظ الحليب و مشتقاته لفترات طويلة، هنا تجدر الاشارة إلى أنه يفضل حفظ الحليب في الثلاجة في عبوات زجاجية داكنة اللون؛ حتى لا تحدث أكسدة و تلف للحليب بسبب الضوء (عبد الحافظ و مبارك، 1996).

## 1. 3. الميكروبات الموجودة في الحليب

الحليب يكون داخل ضرع الحيوان خالي من الميكروبات، و يتلوث بها بمجرد خروجه من الضرع و مروره عبر القنوات اللبنية، إذ يتسرب إليه عدد من الميكروبات من مصادر مختلفة تشمل: الهواء، العلف، التربة، مراعي الحيوانات و معدات و أواني الحلب، إضافة إلى الاشخاص المتداولون للحليب ( Coorevits et

2008, al.). الحليب مركب بيولوجي معقد يعد بيئة غذائية جيدة لنمو العديد من الميكروبات، يحتوي على مصادر غذائية جيدة بالإضافة إلى أنه ذو رقم هيدروجيني يبلغ 6.8 pH و بالتالي يعتبر بيئة جيدة و ملائمة للنمو البكتيري، يحتوي الحليب على بعض الميكروبات الأساسية و التي توجد مترممة به تشمل بكتيريا حامض اللاكتيك الكروية و العصوية (مبارك و آخرون، 2005). في العادة يوجد في الحليب سبعة طرز أو نماذج بكتيرية يمكن لها أن تحدث تغيرات غير مرغوب فيها في الحليب؛ نتيجة لامتلأها للعديد من الانزيمات المسؤولة عن فساد الحليب، هذه البكتيريا يمكن لها أن تنمو في حرارة منخفضة تقل عن 7° م و بالتالي النمو في درجة حرارة الثلاجة تشمل هذه البكتيريا انواع من Micrococci، Bacilli، Staphylococci، Lactobacilli، Coliforms و Pseudomonas (Aslam & Hurley, 1996). تعتبر بكتيريا القولون المؤشر الاساسي للجودة الصحية في صناعة الاطعمة الغذائية و صناعة الحليب و مشتقاته؛ لان وجود هذه البكتيريا يعد دليلاً على تلوث الحليب بمخلفات الحيوان البرازية (سيالة، 1999؛ بعيو، 2003). بتلوث الحليب بالميكروبات يصبح مصدراً للعديد من الأمراض تشمل: السل الرئوي، الزحار، الكوليرا، الدفتيريا، التيفود و الباراتيفود و الحمى القرمزية، كما يمكن للفيروسات هي الاخرى أن تنتقل عن طريق الحليب و تصيب الانسان تشمل فيروسات الجهاز التنفسي، الالتهاب الكبدي و الفيروسات المعوية و التي منها فيروس شلل الاطفال (شحاتة، 1999؛ مبارك و آخرون، 2005).

#### 1.4. فساد الحليب

يرجع فساد الحليب بكتيريولوجياً إلى نمو البكتيريا و نشاطها و تجمع نواتج عمليات الايض التي تقوم بها في الحليب، من أهم انواع الفساد التي يتعرض لها الحليب عقب حلبه تكون الحموضة نتيجة لنشاط أنواع مختلفة من الميكروبات أهمها بكتيريا حامض اللاكتيك التي تحول سكر اللاكتوز إلى حمض اللاكتيك؛ مؤديةً بذلك إلى ارتفاع حموضة الحليب و بتكاثر البكتيريا المتحملة للحموضة من جنس *Lactobacillus* تزداد حموضة الحليب لتصل أكثر من 2 % فتنشط ميكروبات

أخرى محبة للحموضة تشمل الفطريات و الخمائر، و تستهلك الاحماض المتكونة فنتهياً الظروف لنشاط ميكروبات أخرى مثل البكتيريا المحللة للبروتين، غالباً لا يحدث حموضة للحليب المبستر؛ لأنه تم قتل أغلب الميكروبات المخمرة لسكر اللاكتوز، لكن يحدث للحليب المبستر فساد من نوع آخر يعرف بالتجبن الحلو بسبب انزيمات شبيهة بأنزيم الرنين (الرنين انزيم يسبب تخثر الحليب يوجد في امعاء الاطفال و الحيوانات الصغيرة) تفرزها بعض انواع البكتيريا و عادةً ما يتبع التجبن الحلو تحلل للخثرة المتكونة مع تراكم كميات من النواتج النيتروجينية الذائبة محدثةً طعماً مرّاً في الحليب، من البكتيريا المسؤولة عن التجبن الحلو للحليب *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Streptococcus* (عبد الحافظ و مبارك، 1996؛ مبارك و آخرون، 2005).

#### 5.1. طرق الكشف عن ميكروبات الحليب

هناك العديد من الطرق تستخدم في الكشف عن الميكروبات الموجودة في الحليب من هذه الطرق اختبارات اختزال الصبغة (هذه الطريقة لا تعتبر بديلاً لدراسة بكتريا القولون)، تستعمل للكشف السريع على كمية الميكروبات في الحليب المراد اختباره؛ فكلما كان عدد الميكروبات كبيراً كلما اصبح الحليب اسرع في الفساد، يوجد اختباران من هذا النوع: اختبار ازرق الميثيلين و اختبار راي أزورين في هذه الاختبارات الصبغة المعاييرة تضاف إلى الحليب المراد اختباره و المحضن في درجة 36° م، الكائنات الدقيقة في الحليب تختزل الصبغة و تزيل اللون عنها و الوقت اللازم لإزالة اللون من مخلوط الحليب و الصبغة بواسطة الميكروبات يعتبر مؤشراً لمقدار أو حجم الميكروبات، الحليب قليل الجودة تكون فيه نسبة الميكروبات عالية يزال اللون بسرعة، بينما الحليب الجيد يحتاج الي عدة ساعات او أكثر قبل ان يختفي لون الصبغة (سيالة، 1999؛ بعيو، 2003). الطريقة الاخرى هي تقدير الأعداد الكلية للبكتيريا Total Bacteria Counts و لتقدير الأعداد الكلية للبكتيريا يستخدم طريقة العد بالأطباق Plate count مع استخدام بيئة غذائية مناسبة و من ثم

التحضير درجة حرارة 36° م و لمدة 48 ساعة ، بعدها يتم تقدير أعداد المستعمرات البكتيرية في الأطباق ذات التخفيفات العشرية المناسبة المحتوية على أقل من 300 مستعمرة بكتيرية ( و هذا يعد احسن تخفيف) و من ثم حساب متوسط أعداد المستعمرات البكتيرية الكلية و ضربها في معامل التخفيف و فق الآتي.

عدد الوحدات المكونة للمستعمرة / مل = متوسط عدد المستعمرات في احسن تخفيف \* معامل التخفيف \* 1 مل / النقلة (سيالة، 1999؛ بعيو، 2003؛ مبارك و آخرون، 2005).

## 1.6. الهدف من البحث

هذه الدراسة تهدف إلى الكشف عن مدى التلوث البكتيري لأنواع من الحليب المتداول في بعض احياء مدينة سبها.

**المواد و طرق العمل**

**Materials and methods**

## 2.1. جمع العينات

استهدف في هذه الدراسة عينات من حليب الابل و الابقار (شكل 1)، بواقع ثلاثة عينات من كل نوع (3 ابل و 3 ابقار)، جمعت من اماكن بيع الحليب في بعض احياء مدينة سبها (القرضة، المنشية و حجارة و ضواحيها)، اضافة إلى ذلك استهدفت بعض المنتجات المتواجدة في الاسواق الليبية و يقبل عليها الليبيين بكثرة (بما فيها مكان الدراسة- سبها) هي: حليب الصباح "مسحوق"، جهينة، الريحان، إضافة إلى لبن النسيم (ملحق 1).



شكل 1. عينة لحليب الابل و الابقار المستهدفة للدراسة.

## 2.2. وسط النمو

استخدم لعزل البكتيريا من الحليب و تتميتها، وسط آجار عد المستعمرات Plate Count Agar (Tryptone Glucose Yeast agar)، و الذي حضر بحسب ارشادات الشركة المنتجة (Oxoid)، بإذابة 17.5 جرام في لتر من الماء المقطر، عقم في الاوتكلاف على درجة حرارة 121° م و لمدة 15 دقيقة و ترك إلى حين الاستخدام.

## 2.3. اختبار العد الكلي

استخدم في هذا الاختبار وسط Plate Count Agar بعد أن اجري لعينات الحليب المستهدفة للدارسة تخفيفات عشرية في انابيب اختبار تحتوي كل انبوبة على 9 مل ماء مقطر و معقم، هنا تجدر الاشارة إلى ان عينات المنتجات المعقمة خفت حتى  $10^{-3}$ ، في حين العينات الطازجة غير المبسترة خفت حتى  $10^{-6}$ ، من كل تخفيف أخذ 1 مل (النقطة) و وضعت في اطباق بتري معقمة و بواقع تكرارين لكل تخفيف، ثم سُكب عليها الوسط المغذي السالف الذكر و المبرد حتى درجة  $45^{\circ}$  م، مزجت النقطة جيداً بالوسط بتحريكها مع و ضد عقارب الساعة، و تركت إلى أن تصلب الوسط، حضنت الاطباق على درجة  $36^{\circ}$  م و لمدة 48 ساعة، تجدر الاشارة هنا إلى انه تم وضع الأنبوبة  $10^{-1}$  في حمام مائي درجة حرارته  $80^{\circ}$  م لمدة 10 دقائق. بعد التحضين عدت المستعمرات في كل تخفيف باستخدام جهاز عد المستعمرات Colony counter و من ثمّ التعويض في القانون المذكور آنفاً (صفحة 5).

## 2.4. صبغة جرام

أجري للبكتيريا المتحصل عليها من عينات الحليب صبغة جرام بغية التفرقة بين الانواع البكتيرية، فيها تم تحضير مسحة بكتيرية و ثبتت على الشريحة و من ثمّ عوملت بصبغة الكريستال البنفسجي لمدة 20 ثانية، غسلت المسحة بتيار هادئ من الماء، ثم عوملت باليود لدقيقة، بعدها بالكحول لـ 20 ثانية، مرة اخرى غُسلت الشريحة بالماء ثم عُمِلت بصبغة السفرانين لدقيقة، أخيراً غُسلت بالماء و جففت بورق ترشيح، ثم فحصت تحت المجهر بالعدسة الزيتية ( $X=100$ ). البكتيريا التي تحتفظ بلون الصبغة الابتدائية الكريستال البنفسجي تعد موجبة لجرام، بينما التي تفقد لون هذه الصبغة و تكتسب لون الصبغة المضادة السفرانين الحمراء تعد سالبة لصبغة جرام (Brown, 2007).



## 2.5. الوسط التفريقي

اعتمد في تشخيص بكتيريا القولون خاصةً *Escherichia coli* الطريقة التي اشار اليها (Morello *et al.*, 2006)، اعتماداً على دراسة شكل المستعمرة على الوسط المغذي الصلب باستخدام وسط آجار أيوسين ازرق المثلين Eosin "EMB" Methylene Blue agar، يعتبر هذا الوسط انتقائي و تفريقي في أن واحد، فالبكتيريا المستعملة للسكر الثنائي الموجود في الوسط تظهر بشكل مستعمرات معتمة ذات بريق معدني مخضر. حضر وسط EMB وفق ارشادات الشركة المنتجة (Oxoid)، بإذابة 38.5 جرام في لتر من الماء المقطر، ثم عقم في الأوتوكلاف على درجة حرارة 121° م و لمدة ربع ساعة، بعد التعقيم سُكب في اطباق بتري معقمة، ثم لقت الاطباق بالبكتيريا المختبرة، وحضنت على درجة 36° م لمدة 24 ساعة، بعد التحضين فحصت الاطباق و لوحظ لون المستعمرة.

## 2.6. اختبار انزيمي التنفس الكتاليز و الاوكسيديز

اجري هذان الاختباران كما وصف من قبل ( Akhmetsadykova *et al.*, 2015)، حيث أجري الكتاليز في اطباق بتري تحتوي على وسط Plate Count Agar و الملقح بالعزلات البكتيرية، بعد تحضين الاطباق لمدة 24 ساعة عند درجة حرارة 36° م، وضعت قطرات من محلول فوق اكسيد الهيدروجين (6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) على المزرعة المختبرة. تكون فقاعات من الهواء دلالة على امتلاك البكتيريا لهذا الانزيم (Catalase) و عدم ظهور مثل هذه الفقاعات، البكتيريا لا تمتلكه و تعد النتيجة سلبية. فيما يتعلق بالاوكسيديز تنمي البكتيريا أولاً على وسط Plate Count Agar و تحضن على الدرجة و المدة المذكورتين في اختبار الكتاليز، بعد مرور فترة التحضين تنقل كمية قليلة من البكتيريا بإبرة التلقيح (بلاستيك أو معدن) و تمزج على ورق ترشيح مشبع بمحلول Tetramethyl-1-p-phenylene diamine 1%. إذا ظهر لون ارجواني أو ازرق مباشرة بعد المزج دل ذلك على امتلاك

البكتيريا للأنزيم و اعتبرت النتيجة موجبة، و إذا لم يتلون فإن البكتيريا لا تمتلكه و النتيجة سلبية.

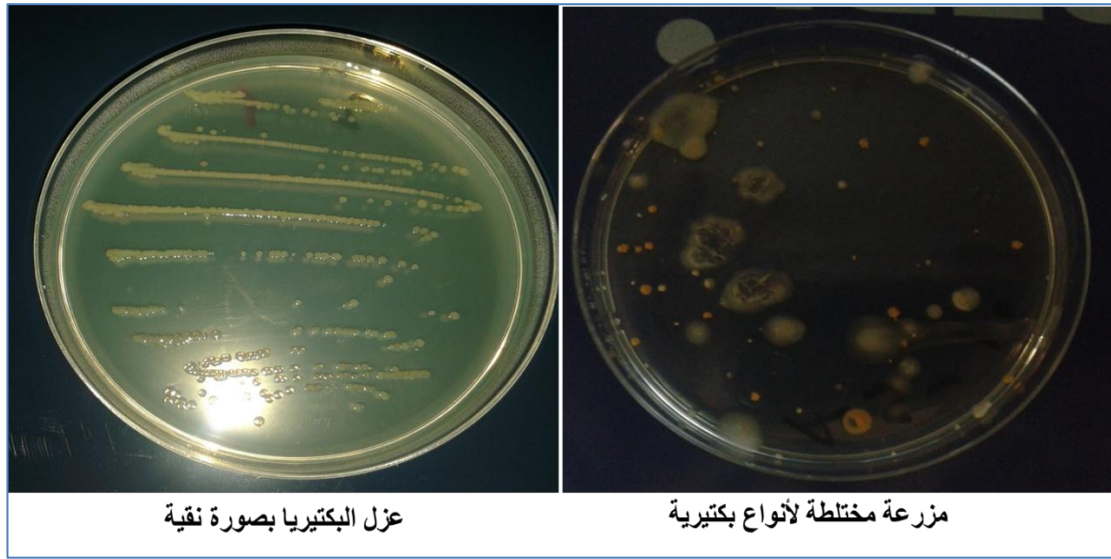
## 2.7. اشرطة API 20E

تم اختبار العزلات البكتيرية السالبة لصبغة جرام لمعرفة قدرتها على تحليل و اكسدة بعض المواد الكيميائية كان كما وصف من قبل (Brown, 2007) باستخدام اشرطة API 20E (BioMérieux, France)، هذه الاشرطة تحتوي على 20 اختبار، بعد حقن الأنابيب بالمعلق البكتيري Bacterial suspension تحضن الاشرطة على درجة حرارة 36° م و لمدة 24-48 ساعة، تلاحظ النتيجة بعد اضافة الكواشف لبعض الاختبارات بتغير في الألوان، النتائج الإيجابية تعطى إشارة (+) و النتائج السالبة إشارة (-)، تشفر النتائج لتعطي في النهاية مجموعة ارقام لا يقل عددها عن سبعة.

# النتائج و المناقشة

## Results and Discussion

نتائج الشكل الظاهري للمستعمرات على وسط Plate count agar لعينات الحليب الطازج بينت تباين في لون المستعمرات من ابيض، كريمي، اصفر و برتقالي، و أيضاً تباين في الحجم و حواف المستعمرة (شكل 2). ظهور هذه الألوان في معظم العينات يفسر بالنمو الغزير أو الكثيف للبكتيريا و اختلاف انواعها و بهذا اتفقت هذه الدراسة مع دراسات اخرى بينت تلوث الحليب بأنواع مختلفة من البكتيريا (Akhmetsadykova *et al.*, 2015).



شكل 2. الوصف الظاهري

نتائج العد الكلي للبكتيريا لعينات المنتجات المصنعة و المتداولة في السوق الليبي (منطقة الدراسة- سبها) بينت خلو هذه العينات من البكتيريا اثناء فتحها مباشرة، و بالتالي سلامة استخدامها من قبل المستهلك، و إن حدث تلوث في هذه العينات حتماً سيكون بعد الفتح، أما عينات الحليب الطازج (إبل و ابقار) بينت النتائج تباين بين عينة و أخرى و بين حليب و آخر، حليب الابقار كان اكثر احتواءً للبكتيريا من حليب الابل (جدول 1 و ملحق 2)، الوحدة المكونة للمستعمرة في حليب الابل كانت ما بين 130.000 - 5.100.000، بينما في الابقار من 7.200.000 - لا تعد، تشير الدراسات إلى أن الحليب غير المبستر يفضل ألا يتجاوز عدد الوحدة المكونة للمستعمرة عن 75.000 وحدة مكونة للمستعمرة / 1 مل، نتائج هذه الدراسة بينت أن

معظم العينات تجاوزت هذا الرقم، و بالتالي ميكروبيولوجياً يجب تجنب استخدام هذا الحليب أو معاملته بالحرارة (البسترة) قبل الاستخدام؛ بالرغم من عدم نجاعة هذه الطريقة خصوصاً مع الانواع المكونة للأبواغ كما في جنس *Bacillus*، و هذا ما اكدته أيضاً نتائج هذه الدراسة من وجود هذا الجنس في اغلب العينات و بالتالي اتفقت مع دراسات اخرى بينت تواجد انواع هذا الجنس في عينات حليب الابقار (Ledenbach & Marshall, 2009). هذه البكتيريا لا يحبذ تواجدها في الحليب؛ لأنها تؤدي الى تخثره؛ بسبب افرازها لأنزيم مشابه للرنين.

جدول 1. نتائج العد الكلي للبكتيريا في عينات الحليب المختبرة "ابل و ابقار".

عينة الحليب 1 (ابل)			
التخفيف	عدد المستعمرات في كل تخفيف	متوسط عدد المستعمرات في كل تخفيف	*CFU/مل
10 <sup>-1</sup>	لا تعد	لا تعد	لا تعد
10 <sup>-2</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-3</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-4</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-5</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-6</sup>	لا تعد	لا تعد	
عينة الحليب 2 (ابقار)			
التخفيف	عدد المستعمرات في كل تخفيف	متوسط عدد المستعمرات في كل تخفيف	مل/CFU
10 <sup>-1</sup>	192 ، 208	200	11.200
10 <sup>-2</sup>	44 ، 68	112	
10 <sup>-3</sup>	0 ، 0	0	
10 <sup>-4</sup>	0 ، 0	0	
10 <sup>-5</sup>	0 ، 0	0	
10 <sup>-6</sup>	0 ، 0	0	
عينة الحليب 3 (ابقار)			
التخفيف	عدد المستعمرات في كل تخفيف	متوسط عدد المستعمرات في كل تخفيف	مل/CFU
10 <sup>-1</sup>	لا تعد	لا تعد	لا تعد
10 <sup>-2</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-3</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-4</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-5</sup>	لا تعد	لا تعد	
10 <sup>-6</sup>	لا تعد	لا تعد	

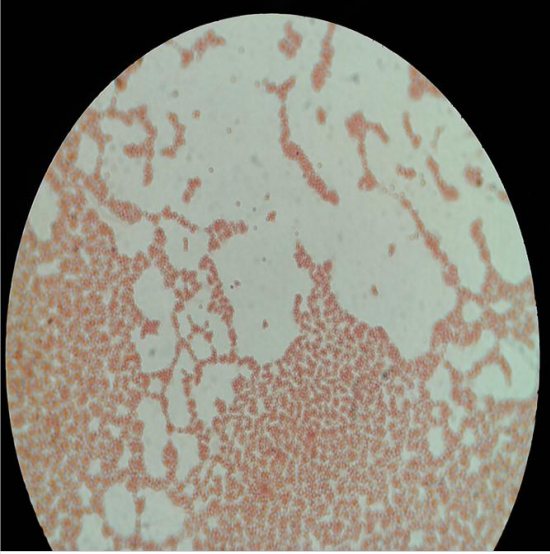
تابع جدول 1. نتائج العد الكلي للبكتيريا في عينات الحليب المختبرة.

عينة الحليب 4 (ابل)			
التخفيف	عدد المستعمرات في كل تخفيف	متوسط عدد المستعمرات في كل تخفيف	مل /CFU
<sup>1</sup> -10	- ، -	لا يعد	<b>130.000</b>
<sup>2</sup> -10	156 ، 124	140	
<sup>3</sup> -10	140 ، 120	130	
<sup>4</sup> -10	6 ، 8	7	
<sup>5</sup> -10	0 ، 6	3	
<sup>6</sup> -10	0 ، 6	3	
عينة الحليب 5 (ابقار)			
التخفيف	عدد المستعمرات في كل تخفيف	متوسط عدد المستعمرات في كل تخفيف	مل /CFU
<sup>1</sup> -10	- ، -	لا يعد	<b>7.200.000</b>
<sup>2</sup> -10	- ، -	لا يعد	
<sup>3</sup> -10	- ، -	لا يعد	
<sup>4</sup> -10	328 ، 344	336	
<sup>5</sup> -10	64 ، 80	72	
<sup>6</sup> -10	2 ، 4	3	
عينة الحليب 6 (ابل)			
التخفيف	عدد المستعمرات في كل تخفيف	متوسط عدد المستعمرات في كل تخفيف	مل /CFU
<sup>1</sup> -10	- ، -	لا يعد	<b>5.100.000</b>
<sup>2</sup> -10	- ، -	لا يعد	
<sup>3</sup> -10	- ، -	لا يعد	
<sup>4</sup> -10	84 ، 116	100	
<sup>5</sup> -10	50 ، 52	51	
<sup>6</sup> -10	4 ، 3	3.5	

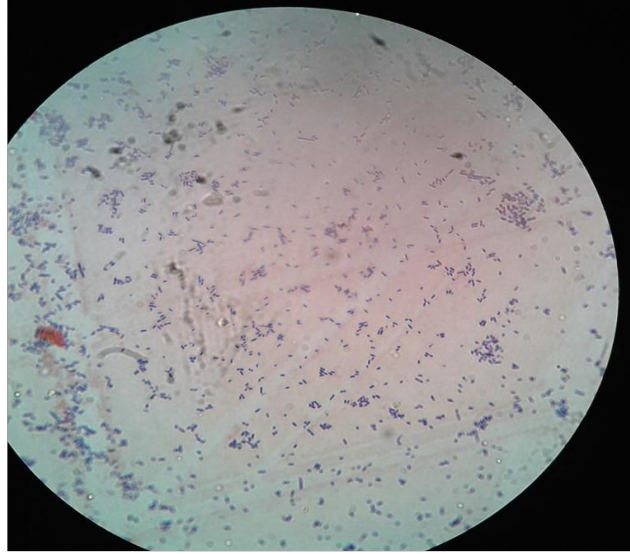
CFU\* يقصد بها الوحدة المكونة للمستعمرة.

احتواء حليب الابقار على عدد اكبر من البكتيريا مقارنة بحليب الابل؛ ربما راجع إلى الاختلاف في التركيب الكيميائي بينهما خاصة سكر اللاكتوز و القلويدات (مناع و عبد الرحمن، 2010). فتزيد القلويدات من نسبة الملح و هذا ما يميز مذاق حليب الابل؛ و بالتالي من الممكن أن تحد الملوحة من نمو البكتيريا، و على النقيض من ذلك يزداد سكر اللاكتوز في حليب الابقار بقيمة تقدر بـ 38.7 جرام/ لتر مقارنة بالابل بـ 25.6 جرام/ لتر و بالتالي يوفر بيئة مناسبة للنمو البكتيري.

نتائج صبغة جرام (شكل 3)، بينت أنه تم الحصول على ستة انواع بكتيرية سالبة لجرام و اربعة موجبة لجرام، مع التنويه على أن هذه الانواع تواجدت في معظم العينات، خاصة الابقار و بهذه تكون الدراسة اتفقت مع دراسات اخرى في هذه السياق تفيد بتواجد كلا القسمين (السالبة و الموجبة) في الحليب، الانواع الموجبة المتحصل عليها شملت *Bacillus sp.*، *Staphylococcus aureus*، *Streptococcus* و *Micrococcus* (Megha & Annadurai, 2014). فيما يتعلق بنتائج الزرع على وسط EMB و الذي اجري على البكتيريا السالبة لجرام بغية الكشف عن تواجد مجموعة القولون خاصة *E. coli*، بينت النتائج أنه لم يتم الحصول على أية عينة تنتمي لهذه البكتيريا و بهذا اختلفت هذه الدراسة مع دراسات اخرى بينت تواجد *E. coli* في عينات الحليب (Srujana et al., 2011). و اتفقت مع دراسة (Torkar & Teger, 2008)، و التي اشارت بخلو الحليب من هذه البكتيريا، لكن بالمقابل احتوت عينات الحليب على بكتيريا اخرى انتمت إلى عائلة *Enterobacteriaceae*، بكتيريا *Bacillus sp.* تعيش في التربة و من الممكن أن تنتقل لضرع الحيوان و تلوث الحليب، النوع الثاني *Staphylococcus aureus* يوجد مترمم على ضرع الحيوان و هو نوع ممكن أن يسبب مرض للإنسان و الحيوان على حدٍ سواء و تواجده غير محبذ في الحليب.



بكتيريا كروية سالبة لجرام (عينة الحليب رقم 6)



بكتيريا عصوية موجبة لجرام (عينة الحليب رقم 2)

شكل 3. اختبار صبغة جرام.



نتائج اختبار انزيمي التنفس، اجري اختبار الكتاليز بقصد التأكد من هوية بكتيريا حامض اللاكتيك الموجبة لجرام أن وجدت و التي تكون سالبة لهذ الانزيم؛ لذا اجري هذا الاختبار على كل العينات التي اعطت نتيجة موجبة لصبغة جرام، بينت النتائج ان كل البكتيريا الموجبة لجرام اعطت نتيجة ايجابية للكتاليز؛ مما يعني أن البكتيريا المتحصل عليها نوع آخر عدا بكتيريا حامض اللاكتيك، فيما يتعلق بالاكسيديز الذي اجري على كل العينات السالبة لجرام، النتائج اظهرت تباين بين العينات البكتيرية المختبرة.

نتائج اختبار API20 (جدول 2 و شكل 4)، و بعد تشفير النتائج للعينات السالبة لجرام و الرجوع إلى دليل Identax (Flores et al., 2009)، لتعريف الانواع البكتيرية تم الحصول على ستة انواع هي: *Erwinia*، *Pasteurella testudinis*، *Chromobacterium fluviatil*، *Provideincia rettgeri*، *herbicola*، *Pseudomonas cepacia* و *Ewingella americana*، منها ما ينتمي إلى عائلة Enterobacteriaceae مثل: *Erwinia*، *Ewingella* و *Provideincia* و منها لعائلة Pseudomonadaceae كـ *Pseudomonas*، و لعائلة Pasteurellaceaea مثل: *Pasteurella* و أخيراً عائلة Flavobacteriaceae و التي ينتمي لها *Chromobacterium* (Tortora et al., 2004; Tille, 2014).

جدول 2. نتائج اختبار API20.

البكتيريا المختبرة						الاختبار	
<i>Ps. cepacia</i>	<i>Pa. testudinis</i>	<i>Er. herbicola</i>	<i>Ch. um fluviatil</i>	<i>Pr. rettgeri</i>	<i>Ew. americana</i>		
+	+	+	-	-	+ *	□-galactosidase	ONPG
-	-	-	-	-	-	Arginine hydrolase	ADH
-	-	-	-	-	-	Lysine decarboxylase	LDC
+	-	-	-	-	-	Ornithine decarboxylase	ODC
+	-	-	-	+	+	Citrate utilization	CIT
-	-	-	-	-	-	H <sub>2</sub> S production	H <sub>2</sub> S
+	-	-	-	+	-	Urea hydrolysis	URE
+	+	+	+	+	+	Tryptophan deamination	TDA
+	-	-	-	-	-	Indole production	IND
+	-	+	+	+	+	Acetone production	VP
+	+	+	+	+	+	Gelatin hydrolysis	GEL
+	-	+	+	+	+	Glucose fermentation	GLU
+	+	+	-	+	+	Mannitol	MAN
+	+	+	-	+	+	Inositol	INO
+	+	+	+	+	-	Sorbitol	SOR

تابع جدول 2. نتائج اختبار API20.

البكتيريا المختبرة						الاختبار	
<i>Ps. cepacia</i>	<i>Pa. testudinis</i>	<i>Er. herbicola</i>	<i>Ch. um fluviatil</i>	<i>Pr. rettgeri</i>	<i>Ew. americana</i>		
+	+	+	+	+	-	Rhamanose	RHA
+	+	+	-	+	-	Sucrose	SAC
+	+	+	-	-	-	Melibiose	MEL
+	+	-	-	+	-	Amygdalin	AMY
+	+	-	-	-	-	Arabinose	ARA
-	+	+	+	+	-	Cytochrome oxidase	Oxidase

\* + نتيجة موجبة للاختبار بعد 24 ساعة من التحضين، - نتيجة سالبة للاختبار بعد 24 ساعة.



شكل 4. اختبار بكتيريا *Ew. americana* على اشرطة API20 E.

ما يلاحظ في هذه الانواع أن بعضها يعيش في التربة و البعض الآخر في الماء و منها الانتهازي الذي يسبب الامراض مثل: *Providencia*، *Ewingella* و بالتالي تواجدها في الحليب يعد من الخطورة بمكان، *Pseudomonas* عادة تعيش في التربة لكنها يمكن أن تلوث الحليب، و تسبب تحلل بروتين الحليب محولة إياه الى احماض امينية بصورة يوريا و نشادر، كما أنها تعمل على تكسير دهن الحليب عن طريق افرازها لأنزيم Lipase، بكتيريا *Chromobacterium* تعيش في التربة و الماء القليل الملوحة (Torkar & Teger, 2008). و بالتالي يفسر تواجدها في عينات الابقار دون الابل؛ لأن الأخيرة كما ذكر اعلاه يمتاز حليبها بنسبة من الملوحة قد تحد من نموها، *Pasteurella* أنواع هذا الجنس من الممكن أن تسبب امراض للإنسان (Tortora et al., 2004).

في هذه الدراسة تواجدت البكتيريا في كل العينات المختبرة، و تلوث الحليب بهذه الانواع ربما راجع لمصادر مختلفة اولها الحيوان نفسه بسبب احتكاك جسمه بحبيبات التربة و عدم تنظيف الضرع قبل عملية الحلب، و ثانيها الاشخاص المشتغلون بحلب الحليب و جمعه و من ثم بيعه؛ لأنه يجب على المنتجين للحليب تبريده مباشرة بعد حلبه و حفظه على درجة منخفضة أقل من 10 ° م لحين تسليمه إلى المستهلك، بالتحري عن مناطق بيع الحليب تبين لنا أن مكان البيع ربما هو الآخر من اسباب تلوث الحليب بهذه البكتيريا، حيث لاحظنا من الدراسة الميدانية أن هناك أكثر من شخص يقوم ببيع الحليب و كل هؤلاء لا يرتدون الملابس الواقية (بالطو) المتعارف عليها في المطاعم و مثل هذه الاماكن، ناهيك عن ذلك أواني جمع الحليب هي الاخرى قد تكون لها دور في هذا التلوث، كما أن للعمالة المشتغلة بحلب الحليب ربما دور في تلوثه؛ و ذلك لكون منطقة الدراسة تزخر بالعمالة الافريقية الوافدة و التي ربما تفتقر حتى للكشف الصحي، أيضاً ربما أواني جمع الحليب هي الاخرى لها دور في هذا التلوث.

البسترة من المفترض أن تقضي على هذه البكتيريا؛ لكن لسوء عملية البسترة دوراً في بقاء هذه البكتيريا حية في الحليب حتى بعد الغلي، حيث أن اغلب الناس و بالأخص ربات البيوت يقمن بتسخين الحليب في اواني مكشوفة على النار مباشرة حتى يفور و يرتفع سطحه ثم يستهلك، هذه الطريقة لا تجعل الحليب يغلى بالمعنى الصحيح بل يجب إتباع الطريقة الصحيحة للغلي؛ و ذلك بتسخينه في حمام مائي و التأكد من وصول الحليب لدرجة الغليان بظهور علامات الغلي مع التقليب الجيد لتوزيع درجة الحرارة على جميع أجزائه لمدة تتراوح من 2- 3 دقائق بعد الفوران، ثم التبريد المباشر بعد التسخين و يحفظ مغطى بارداً لضمان عدم تلوثه بعد الغلي (أحمد و بسطاوروس، 2003).

## الخلاصة

الحليب سائل طبيعي ناتج من افراز غدد الثدي، يعد الغذاء الاول الذي يتناوله المولود بعد ولادته مباشرة، يمتاز باحتوائه على الأقسام الرئيسية للغذاء و التي تشمل الماء، السكريات، البروتينات، الدهون، الأملاح المعدنية و الفيتامينات، و هو ليس غذاء جيد للإنسان و الحيوان وحسب بل أيضاً للكائنات الحية الدقيقة؛ إذ يحتوي على معظم العناصر اللازمة لنموها. استهدف في هذه الدراسة عينات من حليب الابل و الابقار جمعت من اماكن بيع الحليب في بعض احياء مدينة سبها (القرضة، المنشية و حجارة و ضواحيها)، اضافة إلى بعض المنتجات كحليب الصباح، جهينة، الريحان، إضافة إلى لبن النسيم، نتائج العد الكلي للبكتيريا بينت خلو عينات الماركات المصنعة من البكتيريا، أما عينات الحليب الطازج (إبل و ابقار) فتباينت النتائج بين عينة و أخرى و بين حليب و آخر، حليب الابقار كان اكثر احتواءاً للبكتيريا من حليب الابل، حيث كانت الوحدة المكونة للمستعمرة في حليب الابل ما بين 130.000 - 5.100.000، بينما في الابقار من 7.200.000- إلى لا تعد، أما عن نتائج صبغة جرام فبينت أنه تم الحصول على ستة انواع بكتيرية سالبة لجرام و اربعة موجبة لجرام، الانواع الموجبة شملت *Bacillus sp.*، *Staphylococcus aureus*، *Micrococcus* و *Streptococcus*، نتائج اختبار انزيم الكتاليز بينت أن كل البكتيريا الموجبة لصبغة جرام اعطت نتيجة ايجابية لهذ الاختبار و بالتالي يمكننا الجزم بأن هذه الانواع لا تتبع مجموعة حامض اللاكتيك، فيما يتعلق باختبار انزيم الاوكسيديز الذي اجري على كل العينات السالبة لجرام، النتائج اظهرت تباين بين العينات البكتيرية المختبرة، كما ذكر تم الحصول على ستة انواع سالبة لجرام، نتائج اختبار API20 لهذه الانواع و من خلال دليل Identax اتفقت مع الانواع البكتيرية التالية: *Pasteurella testudinis*، *Erwinia herbicola*، *Provideincia rettgeri*، *Chromobacterium*، *Pseudomonas cepacia*، *fluviatil* و *Ewingella americana*، ما يلاحظ في هذه الانواع أن بعضها يعيش في التربة و البعض الآخر في الماء و منها الانتهازي الذي يسبب الامراض و تواجدها في الحليب يعد من الخطورة بمكان؛ لذا ينصح قبل

تناول الحليب بسترتة بشكل جيد؛ و يكون ذلك بتسخينه في حمام مائي و التأكد من وصوله لدرجة الغليان مع التقليب الجيد لتوزيع درجة الحرارة على جميع أجزائه لمدة تتراوح من 2- 3 دقائق بعد الفوران، ثم التبريد المباشر بعد الغلي.

## التوصيات

في نهاية هذه الدراسة نوصي ببعض التوصيات نوجزها في الآتي:

1. التأكد من اماكن بيع الحليب من حيث مراعاتها لشروط الامان الصحي، و شراء الحليب من الاماكن الموثوق بها.
2. يجب إلزام العاملين في اماكن بيع الحليب بارتداء الملابس الواقية (بالطو) المتعارف عليها في المطاعم و مثل هذه الاماكن.
3. البسترة الجيدة للحليب و التأكد من وصوله لدرجة الغليان بظهور علامات الغلي مع التقليب الجيد لتوزيع درجة الحرارة على جميع أجزائه لمدة تتراوح من 2- 3 دقائق بعد الفوران.
4. تفعيل اجهزة الدولة خاصة جهاز الحرس البلدي المنوط له مراقبة اماكن بيع الحليب و الأشخاص المشتغلين بحلبه خاصة العمالة الاجنبية الوافدة.



المراجع

**References**

## المراجع

### أولاً: المراجع العربية

- أحمد، عبد الراضى ثابت و ألفونس فخرى بسطاوروس (2003). الألبان ما لها وما عليها و أثر البيئة في تلوثها، مجلة أسيوط للدراسات البيئية - العدد الرابع و العشرون / مصر.

- بعيو، صالح حمد (2003). تمرينات عملية في علم الكائنات الحية الدقيقة الجراثيم، دار الكتب الوطنية- بنغازي / ليبيا.

- سيالة، عبد الرؤوف حمودة (1999). مذكرات في البكتيريولوجيا العملية، منشورات الجا- بيرن / سويسرا.

- شحاتة، عبده السيد (1999). أمراض ناتجة عن الغذاء، المكتبة الأكاديمية، 121 شارع التحرير- القاهرة / مصر.

- عبد الحافظ، عبد الوهاب محمد و محمد الصاوي محمد مبارك (1996). الميكروبيولوجيا التطبيقية، المكتبة الأكاديمية، 121 شارع التحرير- القاهرة / مصر.

- مبارك، محمد الصاوي محمد و عبد الوهاب محمد عبد الحافظ و راوية فتحي جمال (2005). عالم البكتيريا، مكتبة أوزوريس- القاهرة/مصر.

- مناع، أحمد ممدوح و فادية عبد الحميد عبد الرحمن (2010). الخصائص الطبيعية و الكيميائية لحليب الابل. مجلة اسيوط للدراسات البيئية- العدد الرابع و الثلاثون / مصر.

### ثانياً: المراجع الاجنبية

Akhmetsadykova, S. H., Baubekova, A., Konuspayeva, G., Akhmetsadykov, N., Faye, B. and Loiseau, G. (2015). Lactic

acid bacteria biodiversity in raw and fermented camel milk. *Afri J Food Sci Techno* 6(3), 84- 88.

**Alan Narnam, H. and Jan Juther, L. P. (1994).** Milk and Milk Product. 1<sup>st</sup> Ed. published by Chapman and Hall.

**Anonymous. (2007).** Looking abroad. Dairy Industries International, 72: 26- 27.

**Aslam, M. and Hurley, W. L. (1996).** Proteases in Milk. *Illinois Dairy Report Home Page*. 1- 3.

**Brown, A. E. (2007).** Benson's Microbiological Applications. 10<sup>th</sup> ed. published by McGraw- Hill, New York, USA.

**Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P. and Heyndrickx, M. (2008).** Comparative analysis of the diversity of aerobic-spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *System Appl Microbiol*.

**Flores , O., Belanche, L. A. and Blanch, A. R. (2009).** New multiplatform computer program for numerical identification of microorganisms. *J Clin Microbiol* 47, 4133- 4135.

**Harding, F. (1995).** Milk Quality. 1<sup>st</sup> Ed. published by Blackie Academic and Professional and improvement of Chapman and Hall Wester and cleddens road.

**Kittivachra, R., Sanguandekut, R., Sakulbumrungsil, R., P-hosngphanphance, P. and Srisomboon. J. (2006).** Determination of essential nutrients in raw milk. *J Sci Technol* 28: 115- 120.

**Ledenbach, L. H. and Marshall, R. T. (2009).** Microbiological Spoilage of Dairy Products. *Springer Science+ Business Media* 10.1007/978-1-4419-0826-1\_2, C

**Megha, S. V. and Annadurai, B. (2014).** Isolation and identification of proteolytic bacteria from raw milk samples. *Glob J Bio Sci Biotech* 3(4): 391- 397.

**Morello, J. A.; Mizer, H. E. and Granato, P. A. (2006).** Laboratory Manual And Work Book in Microbiology. 8<sup>th</sup> Ed *The McGraw-Hill companies*.

**Srujana, G., Reddy, A. R., Reddy, V. K. and Reddy, S. R. (2011).** Microbial quality of raw and pasteurized milk samples collected from different places of Warangal district, (A.B) India. *Int J Phar Bio Sci* 2, 139- 143.

**Tille, P. M. (2014).** BAILEY & SCOTT'S Diagnostic Microbiology 14<sup>en</sup> ed. *Mosby, Inc., an affiliate of Elsevier Inc.*

**Torkar, K. G. and Teger, S. G. (2008).** The microbiological quality of raw milk after introducing the two day's milk collecting system. *Act Agri Slovene* 1, 61- 74.

**Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C. L. (2004).** Microbiology an introduction 8<sup>th</sup> ed. Menlo Park, Calif. Benjamin/ Cummings, Publishing.

الملاحق

Appendixes

ملحق 1. منتجات الحليب المستهدفة للدراسة.



ملحق 2. نتائج العد الكلي لعينة الحليب رقم 4 لتخفيفات 10<sup>-2</sup>، 10<sup>-4</sup>، 10<sup>-6</sup>.

