

## العد المجهرى المباشر Direct Microscopic Count :

تعتمد الطريقة على فحص حجم معين من نموذج الحليب او الأغذية السائلة بشكل غشاء مصبوغ مباشرة تحت المجهر ، ويسمح التصيغ بتمييز شكل وتجمعات البكتريا والخلايا الجسمية في النموذج . وهذه الطريقة تسمح بأعطاء حكم سريع على احتمالية وجود مشاكل في النوعية في المنتجات ، وتعتمد دقة الطريقة بشكل فعال على تأهيل القائمين بها وكثرة استعمالهم لها.

وتعطي الطريقة اختبار سريع للتلوث البكتيري في الحليب او الكريم الخام المأخوذ مباشرة من المنتج او خزانات التبريد ويمكن انجاز الفحص خلال 10-15 دقيقة . يدل وجود الخلايا الجسمية بكثرة في العينة على ان الحليب مأخوذ من حيوان مصاب بمرض التهاب الضرع.

### الطريقة:

1- بواسطة سرنجة او ماصة خاصة ينقل 0.01 مل من نموذج الحليب الى شريحة زجاجية نظيفة ذات حقل او عدة حقول مساحتها 1سم<sup>2</sup> بشكل دائري . ينشر الحليب على كل المساحة بواسطة ابرة معقمة ويترك ليحفظ بالهواء او يوضع في صناديق تجفيف خاصة.

2- تغمر الشرائح في محلول صبغة الميثيلين الازرق لمدة دقيقتين تشطف بعدها بالماء وتترك لتجف .

3- تفحص النماذج تحت المجهر بالعدسة الزيتية وتعد كل خلية بكتيرية منفصلة او كل مجموعة خلايا مجتمعة كتجمع واحد. يعد عدد من الحقول المجهرية كافيا ومتناسبا مع عدد البكتريا في الحقل حيث يعد بين 10-50 حقلا.

اما عدد الحقول المجهرية فيمكن تقديره بقياس مساحة الحقل المجهرى الواحد بواسطة عدسة قياسها مايكرومترى ومن ثم استخدام المعادلة التالية:

حيث نق = نصف قطر الحقل المجهرى

ومتوسط عدد البكتريا في الحقل الواحد هو ناتج جمع عدد البكتريا في كل الحقول مقسوما على عدد الحقول

## العد غير المباشر Indirect Method :

هناك عدة طرق لعد الأحياء المجهرية في الحليب ومنتجاته اهمها طريقة العد القياسي للأطباق **Standard plate count** وهي مناسبة للحليب الخام والمبستر ومعظم منتجات الألبان الاخرى عدا المنتجات اللبنية المتخمرة كاليوكرت والحليب البلغارى وغيرها والتي يتم تصنيعها بأضافة البادئات البكتيرية لها لأن هذه المواد ستكون حاوية على اعداد مايكروبية عالية مسبقا.

### الطريقة:

1- ترج قنينة العينة حوالي 25 مرة للحصول على خليط متجانس ويعقم غطاء القنينة بمحلول كحولي 70% قبل الفتح.

2- ينقل بواسطة ماصة معقمة 11 مل من قنينة العينة الى 99 مل محلول تخفيف مناسب ، ترج قنينة التخفيف 25 مرة للحصول على محلول متجانس وتكمل بقية التخفيف للحد المناسب.

3- ينقل 1 مل من كل تخفيف الى طبق بتري فارغ معقم ويضاف له 12 مل من الوسط الزرعي Standard plate agar (يعني اي وسط نحن نريد استعماله) ويدور الطبق يمينا ويسارا لمزج المواد جيدا ويترك ليتصلب.

4- تحضن الأطباق بصورة مقلوبة بدرجة 32°م لمدة 48 ساعة ثم تعد المستعمرات في الأطباق الحاوية على 30-300 مستعمرة ويقرب العدد الى رقمين صحيحين فقط ويضرب في مقلوب التخفيف.

#### \* فحص البكتريا النامية في البرودة Psychrotrophic bacteria :

هناك العديد من الأحياء المجهرية التي تنمو تحت درجات الحرارة الباردة ويكون امثل درجة لنموها اقل من 20°م وتسمى محبات (الفات) البرودة Psychrophilic ، بينما توجد مجموعة اخرى واسعة من الأحياء المجهرية التي يمكنها النمو بسرعة بدرجة 7°م او اقل بغض النظر عن درجة حرارة نموها المتلى وتسمى psychrotrophic وهي اكثر أهمية في صناعة الألبان لأنها قد تسبب عيوباً في الطعم والنكهة عند نموها في منتجات الألبان. وتشمل اجناساً متعددة منها Pseudomonas, Alkaligenes, Flavobacterium , و انواع تعود لأجناس Bacillus, Clostridium, Streptococcus, إضافة لبعض الخمائر والأعفان.

#### الطريقة:

1- بعد تحضير التخفيف المناسبة ينقل 1 مل من كل تخفيف الى طبق فارغ ويضاف له 12-15 مل من وسط Standard plate agar ويترك ليتصلب.

2- تحضن الأطباق بدرجة 7°م لمدة 10 أيام وتعد المستعمرات النامية.

#### \* فحص البكتريا المحبة للحرارة Thermophilic bacteria :

في صناعة الألبان يقصد بها البكتريا التي تنمو في الحليب المحفوظ بدرجة 55°م أو أكثر بما فيها درجة حرارة البسترة البطيئة (63°م) وعادة تلك البكتريا تكون من الأنواع التابعة لجنس Bacillus التي تلوث الحليب من مصادر مختلفة من المزرعة واجهزة الحليب غير النظيفة . عند حفظ الحليب بدرجة حرارة عالية لفترة طويلة ستنمو البكتريا بسرعة مسببة عيوب النكهة إضافة لزيادة العدد القياسي للبكتريا في النموذج.

#### الطريقة:

تحضر تخفيف مناسبة من عينة الحليب وينقل 1 مل من كل تخفيف الى طبق فارغ ويضاف له (15-18) مل من الوسط الزرعي Standard plate agar ويجب زيادة كمية الوسط لمنع الجفاف في الطبق ثم تحضن الاطباق بدرجة 55°م لمدة 48 ساعة ثم تحسب المستعمرات النامية.

#### \* فحص البكتريا المتحملة للحرارة Thermoduric bacteria . :

وهي البكتريا التي تتحمل المعاملة الحرارية التي تزيد عن درجة الحرارة القصوى لها ولا تنمو عندها ، وفي صناعة الألبان يعني بها البكتريا التي تبقى حية بعد معاملة البسترة وتشمل اجناساً متعددة مثل Micrococcus Bacillus, Lactobacillus, Streptococcus, Microbacterium, وايضا بعض العصيات السالبة لصبغة كرام مثل Salmonella، اهم مصادرها اوعية واجهزة الحليب غير النظيفة في المزرعة والمعمل .

## فحص بكتريا القولون Coliform bacteria

تعود هذه المجموعة من البكتيريا الى عائلة **Enterobacteriaceae** ومن اهم افرادها بكتريا **Escherichia coli** والتي مصدرها الأمعاء وبكتريا **Enterobacter aerogenes** والتي مصدرها النباتات و احيانا الأمعاء. تصل تلك المجموعة للحليب من مصادر متعددة كالبرا والماء الملوث والتربة وان وجودها يعتبر دليلا على التلوث سواء كان من مصدر برازي **Faecal type** او غيره. ان تواجد بكتريا القولون في الحليب المبستر يعتبر دليلا لعدم كفاءة عملية البسترة او حصول التلوث بعد البسترة

أ- طريقة الزرع القياسي للأطباق : وتتضمن :

1- تحضر سلسلة من التخفيف للعينة وينقل 1 مل من كل تخفيف الى طبق فارغ ويضاف له 12 مل من الوسط المتخصص **Macconkey agar** أو **Violet Red Bile Salt agar** يمزج النموذج مع الوسط ويترك ليتصلب. يغطي سطح الوسط بطبقة اخرى من نفس الوسط ويترك ليتصلب.

2- تحضن الأطباق بدرجة 32°م لمدة 48 ساعة وتعد المستعمرات الحمراء الداكنة .

3- يجرى فحص تأكيدي للمستعمرات بنقل عدد من المستعمرات بواسطة الأبرة الى انابيب تخمر تحتوي على وسط **Brilliant Green lactose broth** أو وسط **Macconkey broth** وتحضن الأنابيب بدرجة 37°م لمدة 24-48 ساعة لملاحظة تكون الغاز والحامض، ثم ينقل ملئ الشراج من هذه الأنابيب الموجبة وتزرع بالتخطيط على اطباق تحتوي وسط **Eosin Methylene Blue agar (EMB)** وتحضن الأطباق بدرجة حرارة 32°م لمدة 24 ساعة وتلاحظ المستعمرات السوداء اللماعة بلون مخضر او البنية الداكنة المركز . ولغرض التفريق بين جنسي **Enterobacter , Escherichia** يمكن اجراء فحص (IMVIC) .

ب- طريقة العد الأكثر احتمالي **Most Propable Number** :

1- تحضر عدد من انابيب التخمر الحاوية على وسط **Macconkey broth** او وسط **Brilliant green bile lactose broth** المعقم ثم تلقح ب 1مل من كل تخفيف ( يزرع 3- 5 انابيب لكل تخفيف) .

2- تحضن الأنابيب بدرجة 32°م لمدة 24-48 ساعة وتفحص لوجود الغاز والحامض. تحضر 3 تخفيف الأخرى قبل اخر تخفيف سالب لوجود البكتريا ويستخرج اعداد بكتريا القولون بالعينة اعتمادا على جداول خاصة عد بكتريا القولون = قيمة MPN من الجدول x مقلوب التخفيف الوسطي.

\*تمييز بكتريا القولون المعوية **Faecal Coliform** :

1- تحضر أنابيب تخمر تحوي وسط **Macconkey broth** أو **Lactose broth** وتلقح ب 1 مل من كل تخفيف .

2- تحضن الأنابيب بدرجة 44.5°م في حمام مائي لمدة 24-48 ساعة ويكشف عن وجود الغاز المتجمع في أنابيب درهام.