البكتريا المكونة للسبورات المعزولة من الحليب المعقم في معمل ألبان الموصل

فيصل عمر محمد
قسم علوم الأغذية/ كلية الزراعة والغابات / جامعة الموصل / العراق

الخلاصة

أُجريت هذه الدراسة للكشف عن البكتريا المكونة للسبورات التي تكون في الغالب البكتريا الرئيسية في الحليب المعقم والتي قد تسبب تلف الحليب حيث أمكن عزل ٤٦ عزلة من الحليب المعقم المنتج في معمل ألبان الموصل خلال مدة أربعة أشهر (تموز وأب وأيلول وتشرين الأول). وقد تم تشخيص هذه البكتريا والتي كانت جميعها تعود للجنس Bacillus التي شملت *B.licheniformis, B.subtilis B.circulans,* والبكتريا *B.megaterium* والتي كان نسب توزيعها ٥٢ و٢٤و١٥و٩% من مجموع العزلات ، على التوالي.وعند دراسة تأثير عملية التخزين لمدة ٤ أسابيع على ٣٥مْ على العدد الكلي للسبورات وعلى نسبة القناني التالفة من الحليب المعقم لوحظ أن عدد السبورات إزداد مع زيادة مدة التخزين وتراوح العدد بين ٣-٩٧ سبور/مل ولوحظ أيضاً تلف نسبة عالية من الحليب المخزن حيث بلغت نسبة التلف في الأسبوع الثالث من آب ٥% أعقبها تلف ٥% إضافية في الأسبوع الرابع أما في شهر أيلول فكانت نسبة التلف ١٠% والتي حدثت في الأسبوع الرابع فقط أما شهري تموز وتشرين الأول فلم يحصل تلف يحصل تلف للحليب خلال فترات التخزين. حموضة الحليب لم تتأثر خلال فترات التخزين وتراوحت في المدى ١ ٢-٣ ٠% وهذا يؤكد أن سبب التلف هو ليس الحموضة ولكن عوامل أخرى خصوصاً تحلل البروتين.

المقدمة

قد لا يخلو الحليب الخام من البكتريا المكونة للسبورات خصوصاً عند إنتاجه تحت ظروف غير صحيحة، وتمثل عادة البكتريا العائدة للجنسBacillus حوالي ٩٥% من هذه الأنواع مع احتمال إن البكتريا العائدة للجنس Clostridium تمثل النسبة الباقية (Roushdy ،١٩٩٣). أما فيما يخص مقاومة سبوراتها للحرارة فان السبورات التابعة لبكتريا الجنس الأول تكون أكثر مقاومة من تلك التابعة للجنس الثاني لهذا فسيكون من النادر وجود الأخيرة في الحليب المعقم. (Davies ، ١٩٧٥ و Anap واخرون ،٧ ١٩) .

وجد Al-Barani (١٩) إن سبب تلف الحليب المعقم يرجع بالدرجة الأساسية إلى البكتريا المتجرثمة العائدة للجنس Bacillusالتالية *B.circulans، B.cereus، B.licheniformis، B.coagulans* وبالنسب ٥٦ و٢٢ و١١ و١١% على التوالي. وفي مصر لاحظ Shehata وآخرون (١٩) إن أعلى نسبة من البكتريا المكونة للسبورات في الحليب المعقم بطريقة التعقيم فائق الحرارة UHT كانت *B.subtilis*. كما بين Blake وآخرون (١٩٩٥) إن سبب تلف الحليب المعقم يرجع لنشاط البكتريا المتجرثمة الميزوفيلية بدرجة اكبر من البكتريا المكونة للسبورات الثرموفيلية حيث احتوت ٤٣% من قناني الحليب المعقم على عدد تراوح بين ١-١٠٠ سبور/مل للنوع الأول بينما ٣٢% من القناني احتوت على ما يقارب العدد نفسه (٤ – ٩٧ سبور/قنينة) من النوع الثاني من البكتريا المكونة للسبورات.

كان الهدف الأساسي من إجراء هذه الدراسة هو الكشف عن البكتريا المكونة للسبورات في الحليب المعقم وتصنيفها ودراسة بعض خواصها والتي تكون في الغالب مسؤولة عن تلف الحليب المعقم في مدينة الموصل وكذلك دراسة تأثير التخزين على بعض خواصه.

مواد وطرق البحث

مصدر الحليب المعقم: تم الحصول على الحليب المعقم من معمل ألبان الموصل خلال فترة أربعة أشهر من شهر تموز وإلى شهر تشرين الأول من العام ٢٠٠٢ حيث أخذت عينات الحليب المعقم من اليوم الأول لإنتاج الوجبة المصنعة في ذلك الشهر.

تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٤/١٢/١٢ وقبوله ٣ / /٢٠٠٥

عزل وتنقية وتصنيف البكتريا: جرى نقل عينات الحليب بطريقة معقمة إلى دوارق زجاجية مخروطية معقمة وخزنت على ٣٠°م لمدة عشرة أيام. واخذ ١ مل من عينة الحليب المحضن وجرى تخفيفها بمحلول رنكر (Quarter Strength Ringer Solution) وتم حسب تخافيف مختلفة في أطباق على وسط (YGPA) والموصوفة من قبل Hassan وآخرون (١٩٩٣). حضنت بعدها الأطباق عند درجة ٣٠ م لمدة ٢٤ ساعة وتم زرع مستعمرات مختلفة مورفولجيا في مرق مغذي Nutrient broth وبعد التحضين لمدة ٢٤ ساعة على ٣٠ م تم نقل Loopful من المزرعة ولقحت في مخروط زجاجي احتوى على ٥٠ مل من الماء المقطر وخلطت بشكل جيد.

وللحصول على المستعمرات المعزولة ، زرع ١ مل من المعلق في كل طبق حيث تم اخذ مكررين وحضنت الأطباق على درجة ٣٠ م لمدة ٤ ساعة بعد ذلك تم تشخيص أنواع الجنس Bacilllus طبقاً للاختبارات الموصوفة من قبل MacFaddin (١٩٧٦).

تخزين العينات : خزنت عينات الحليب المعقم (٣٠ قنينة) من كل وجبة على درجة ٣٥م من اليوم الأول من إنتاجه لمدة أربعة أسابيع للأشهر الأربعة المشمولة بهذه الدراسة وجرى الكشف عن عدد السبورات حسب الطريقة الواردة في APHA (١٩٩٢) وجرى حساب النسبة المئوية للقناني التالفة أسبوعياً.

قدرت الحموضة وجرى أيضاً تقدير النيتروجين الكلي والنيتروجين الذائب خلال فترات التخزين وحسب الطرق المذكورة في Ling (١٩٦٣).

النتائج والمناقشة

عزل وتشخيص البكتريا المكونة للسبورات (Spore – Forming Bacteria): تم عزل ٤٦ عزلة من البكتريا المكونة للسبورات من الحليب المعقم وقد جرى التشخيص لهذه العزلات إلى مستوى النوع (Species) بإتباع الشكل المظهري والبايوكوكيميائي الذي تم وصفه من قبل MacFaddin (١٩٧٦) حيث ظهر بأن كافة العزلات المكونة للسبورات كان لها نفس الصفات المظهرية لأفراد الجنس Bacillus التي جرى توضيحها من قبل Al-badrani (١٩) من حيث الشكل والحركة وموقع السبور وصبغة كرام التي تعطي دليل مبدئي لعائديتها لهذا الجنس وكما موضح من قبل العديد من الباحثين كون أن سبورات هذا الجنس تكون موجودة في معظم أنواع الحليب المعقم (Davies ، ١٩٧٥ و Dawood وآخرون، ٢٠٠١).

وبمقارنة نتائج الاختبارات التشخيصية البايوكيميائية للعزلات المبينة في الجدول (١) مع الجداول التشخيصية للباحث MacFaddin (١٩٧٦) اتضح إن كافة العزلات كانت ترجع إلى بعض الأنواع للجنس Bacillus التالية: *B.subtilis, B.circulans ، B.licheniformis ، B.megaterium* والتي ظهر توزيعها النسبي في الجدول (٢) حيث كانت البكتريا B.subtilis هي النوع الرئيسي والتي مثلت حوالي ٥٢% من مجموع العزلات تلته البكتريا *B.circulans* بنسبة ٢٣% بينما بلغ النوع الثالث المتمثل بالبكتريا *B.licheniformis* ١٥% في حين أن النوع الأخير والذي بلغت نسبته % كان من نصيب البكتريا B.megaterium وهذا ينطبق إلى حد كبير مع ما وجده Shehata وآخرون (١٩) الذين لاحظوا أن الحليب احتوى على البكتريا *B.subtilis* النوع الرئيسي سواءاً كان في الحليب الخام أو الحليب المعقم وكذلك اتفقت النتائج مع ماوجده Kim و Huh (١٩) اللذين عزلا ٦٧ عزلة من البكتريا المتجرثمة من الحليب المعقم في كوريا حيث وجد أن البكتريا السائدة كانت *B.subtilis* وبنسبة ٦٤% من البكتريا المكونة للسبورات في حين انها اختلت مع ماوجده Dawood وآخرون (٢٠٠١) الذي وجد ان البكتريا *B.licheniformis* كانت هي السائدة في الحليب المعقم بطريقة UHT في مصر.

كما لوحظ من الجدول (٣) إن فترات التخزين كان لها تأثير على تلف الحليب المعقم خلال بعض أشهر السنة إذ وجد إن نسبة التلف في قناني الحليب المعقم لشهر آب بلغت ٥% في الأسبوع الثالث عندما كانت عدد الجراثيم في المليلتر الواحد من الحليب ٥٣ جرثومة والتي ارتفع عددها في الأسبوع الرابع إلى ٩٢ جرثومة مما أدى إلى تلف نسبة ٥% إضافية أي أصبح عدد القناني التالفة خلال هذا الشهر ما يعادل ١٠%. كذلك حصل في شهر أيلول تلف في الحليب المعقم بلغ ١٠% في الأسبوع الرابع فقط من هذا الشهر وكان عدد الجراثيم في الحليب٩٧ جرثومة /مل.

الجدول (١): الاختبارات التشخيصية للبكتريا المكونة للسبورات المعزولة من الحليب المعقم

نوع الاختبار	عدد العزلات	% للعزلات	نوع الاختبار	عدد العزلات	% للعزلات
النمو على درجة ٤٥°م	٤٦	١٠٠	تحليل النشا	٤٢	٩١
النمو على درجة ٦٠°م	صفر	صفر	اختزال النترات	٣٣	٧٢
النمو عند pH ٥	٤٦	١٠٠	إنتاج الاندول	صفر	صفر
النمو عند وسط ملحي ٧%	٤٦	١٠٠	تحليل الجيلاتين	٤٦	١٠٠
النمو في بيئة الكلوكوز	٠٧	١٥	تحليل الكازين	٤٦	١٠٠
الاستفادة من الستريت	٤٦	١٠	تخمير الارابينوز	٣٥	٧٦
اختبار (Voges Proskauer)	٣٧	٠	تخمير المانيتول	٣٥	٧٦

الجدول (٢): توزيع الأنواع العائدة للجنس Bacillus المعزولة من الحليب المعقم.

النوع	عدد العزلات	% للعزلات	النوع	عدد العزلات	% للعزلات
B.subtilis	٢٤	١٧ ٥٢	B.licheniformis	٧	٢٢ ١٥
B.circulans	١١	٩١ ٢٣	B.megaterium	٤	٧٠

الجدول (٣): تأثير فترات التخزين في ٣٥° م على العدد الكلي للجراثيم وعلى نسبة القناني التالفة من الحليب المعقم خلال أربعة أشهر

الاسابيع	تموز		اب		ايلول		تشرين لاول	
	س/مل	ق.ت(%)	س/مل	ق.ت(%)	س/مل	ق.ت(%)	س/مل	ق.ت(%)
الأول	٦	-	١١	-	٩	-	٣	-
الثاني	٢١	-	٣٢	-	٢٤	-	١٢	-
الثالث	٢	-	٥٣	٥	٤٥	-	١٩	-
الرابع	٣٩	-	٩٢	٥	٩٧	١٠	٢٧	-

س/مل = سبور / مليلتر ق.ت % = % للقناني التالفة

أما في الشهرين الآخرين (تموز و أيلول) فلم يلاحظ أي تلف للحليب المعقم المخزن للفترات نفسها ولوحظ إن عدد السبورات كان منخفض نسبياً وقد وصل في نهاية فترات التخزين ٣٩ و ٢٧ سبور/مل لهذين الشهرين، على التوالي.

أما تأثير التخزين على بعض الاختبارات الكيميائية والذي يمكن ملاحظته من الجدول (٤) يبين إن الحموضة كانت في المدى الطبيعي المعقول والذي تراوح بين ١ ٠ ٢٣ ٠ % مقدرة كحامض لاكتيك خلال فترات التخزين وللأشهر الأربعة وهذا يدل على ان سبب تلف الحليب المعقم هو ليس ارتفاع الحموضة لكن لوحظ انه حصل زيادة بسيطة في الحموضة مع تقدم فترات التخزين والتي أيضا تعد طبيعية ويمكن أن تعزى إلى تأثير فترات التخزين ودرجة الحرارة وهذا يتطابق مع ما وجده Roushdy (١٩٩٣) الذي أعزى الزيادة البسيطة في الحموضة إلى التفاعل بين اللاكتوز والبروتين آو للتغير في توازن فوسفات الكالسيوم. وبخصوص النتروجين الكلي الذي كان في الأسبوع الأول من التخزين متقارب في عينات الحليب للأشهر الأربعة إن نسبته بدأت بالانخفاض التدريجي مع التقدم بفترات التخزين وهذا الانخفاض رافقه في الوقت ذاته زيادة في النسبة المئوية للنيتروجين الذائب خلال فترات التخزين وقد يعزى الانخفاض بالـ TN إلى تحلل البروتين بفعل الإنزيمات المحللة للبروتين والمعروف إنتاجها من قبل أفراد الجنس *Bacillus*.

الجدول (٤): تأثير التخزين على الحموضة (LA %) والنتروجين الكلي (TN %) والنتروجين الذائب(SN %) خلال فترات التخزين لكل من الأشهر الأربعة

الاسابيع	تموز			اب			ايلول			تشرين الاول		
	LA	TN	SN	LA	TN	SN	LA	TN	SN	LA	TN	SN
الاول	١٩ ٠	٥٤٤ ٠	٢٧ ٠	٢١ ٠	٥٣٣ ٠	٢٧٩ ٠	٢٢ ٠	٥٣٦ ١٠	٢ ٠	١ ٠	٥٣ ٠٠	٢ ٠
الثاني	١٩ ٠	٥٤٢ ٢٠	٢ ٠	٢٢ ٠	٥٢١ ٥	٢ ٠	٢٢ ٠	٥١٧ ٠	٢٩٤ ٠	١٩ ٠	٥٢٧ ٧٠	٢ ٠

الثالث	٢٠	٠	٥١	١٠	٢	٠	٢٢	٠	٥٠٦	٠	٢٩٩	٠	٢٣	٥	٤	٠	٣١٥	٠	٢٠	٠	٥١٥	٠	٢٩٣	٠
الرابع	٢٢	٠	٥٠٧	٠	٢٩٦	٠	٢٣	١٧٠	٤	٠	٢١٣	٠	٢٣	٠	٤٦١	٠	٣٢٤	٠	٢٠	٠	٥٠٣	١٠	٣٠١	٠

SPORE FORMING BACTERIA ISOLATED FROM STERILIZED MILK IN MOSUL MILK PLANT

F.O. Mohammed,
Food Sci. Dept., College of Agric. & Forestry, Mosul Univ., Iraq

ABSTRACT

This study was performed to detect the spore forming bacteria that frequently represent the major bacteria in sterilized milk that might cause milk deterioration. A total of 46 isolates were noticed in sterilized milk produced by the Mosul milk plant through a period of four months (July, August, September and October). These isolated bacteria all belonged to the genus Bacillus which included *B.subtilis, B.circulans, B.licheniformis* and *B.megaterium* that represented 52,23,15 and 8% , respectively. The influence of storing process for 4 weeks at 35°C on the number of spores and upon the ratio of deteriorated sterilized milk samples revealed that the number of spores increased upon the increase in storage time and ranged from 3-97 spores/ml. and it was also noticed that the percentage of deteriorated milk samples were relatively high, 5% during the third week of storage in August followed by another 5% the next week. While during September, the deterioration took place through the fourth week and had 10% of the stored bottles, whereas no deterioration was observed through both July and October. The acidity levels of sterilized milk were within the normal, 0.18 – 0.23 % which leads to a conclusion that deterioration due to the proteolysis of milk proteins.

المصادر

Al-Badrani , H.S. (1980). Bacteriological and chemical. studies of sterilized milk (in Arabic) M.Sc. Thesis, College of Agric. and Forestry, Mosul Univ., Iraq.

Anap G.R; S.P Angrwala, and G.R. Patil (1987). Studies on UHT processing of buffalo milk. Indian J.Dairy Sci. 40:273.

APHA (1992) . Standard methods for the examination of dairy product. 16th ed., Washington. USA .

Atherton,H.V and J.A Newlander (1977) . Chemistry and testing of dairy products. AVI publishing Company , ING. Westport, Connecticut.

Blake, M.R; B.C. Weimer, and P.A Savello (1995) Sensory and microbial quality and shelf-life of milk processed by direct steam injection .J. Food Protection, 85(9):1007-1013.

Davies ,F.L.(1975) . Heat resistance of Bacillus species. J. Society Dairy Techn . 28:69-74.

Dawood , H.A.; S.M Abdou, and E.E.Isamail (2001).Evaluation of UHT milk during storage Proc. 8th Egyptian Conf. Dairy Sci. 149-162.

Hassan, A.N.; A.S. Zahran ; N.H Metwalli, S.I.Shalabi (1993). Aerobic spore-forming Bateria isolated from UHT milk produced in Egypt, Egyptian J.Dairy Sci. 21:121-128.

Kim, H.U and C.S.Huh (1983). A study on Bacillus species occurring in korean UHT market milk. Korean J.Dairy Sci. 5:29-33.

Ling, E.R. (1963) A text book of dairy chemistry. Vol.2. practical. Champan and Hall Ltd. London.

MacFaddin , J.F.(1976).Biochemical tests for identification of medical bacteria . Waverly press INC, Baltimore .USA.

Roushdy, I.M.(1993). Studies on the microbiological quality of heat-treated milks.Ph.D Thesis Faculty of Agr. ,Ain Shams Univ., Cairo,Egypt.

Shehata. A.E.; M.N. Magdoub; E.S. Nagwa, and Y.A. El-Samargy (1983). Aerobic spore-forming bacteria in buffalo milk .J.Dairy Sci. 66: 1228-1236.